



PCT.FR 2004/000127

REC'D 14 MAY 2004

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 05 AVR. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 • W / 210502

REMISE DES PIÈCES DATE 21 JAN 2003 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0300622 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 21 JAN. 2003		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet ARMENGAUD AINE 3, Avenue Bugeaud 75116 PARIS	
Vos références pour ce dossier (facultatif) CPIAC 60.889			
Confirmation d'un dépôt par télécopie		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
2 NATURE DE LA DEMANDE		Cochez l'une des 4 cases suivantes	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
ou demande de certificat d'utilité initiale		N°	Date
Transformation d'une demande de brevet européen		<input type="checkbox"/>	
Demande de brevet initiale		N°	Date
3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum) MOYENS POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES HUMAINES DE L'ANT			
4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE		Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° Pays ou organisation Date N° <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)		<input type="checkbox"/> Personne morale <input type="checkbox"/> Personne physique	
Nom ou dénomination sociale		THERAPTOSIS	
Prénoms			
Forme juridique			
N° SIREN			
Code APE-NAF			
Domicile ou siège	Rue	Pasteur Bio Top 25 rue du Docteur Roux	
	Code postal et ville	75116 PARIS	
	Pays	FRANCE	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2^{ème} page


**BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES
DATE **21 JAN 2003**
LIEU **75 INPI PARIS**
N° D'ENREGISTREMENT **0300622**
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

08 540 W / 210502

6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)		
Nom		PEAUCELLE
Prénom		Chantal
Cabinet ou Société		Cabinet ARMENGAUD AINE
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		92-1189
Adresse	Rue	3, Avenue Bugeaud
	Code postal et ville	75 011 PARIS
	Pays	FRANCE
N° de téléphone (facultatif)		01-45-53-05-50
N° de télécopie (facultatif)		01-45-53-80-21
Adresse électronique (facultatif)		armengau@club-internet.fr
7 INVENTEUR (S)		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEAUCELLE Le 21 janvier 2003		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI 

« MOYENS POUR LA REGULATION DE
L'EXPRESSION DES ISOFORMES
HUMAINES DE L'ANT »

L'invention a pour objet des moyens pour la régulation de l'expression des isoformes humaines de l'ANT, plus particulièrement des duplex d'ARN interférants (ARNi) et leurs applications pour ladite régulation et les applications des
5 ADNc codant pour les isoformes.

Le translocateur nucléotidique à adénine (ANT) est la protéine la plus abondante de la membrane interne des mitochondries. L'ANT possède deux fonctions distinctes : c'est
10 d'une part, le responsable du transport des nucléotides à adénine à travers la membrane mitochondriale interne (import de l'ADP pour la phosphorylation oxydative ; export d'ATP vers le cytosol pour le métabolisme général). D'autre part, l'ANT joue un rôle essentiel lors de la phase mitochondriale de l'apoptose. En effet, l'ANT peut adopter une conformation de
15 pore non-spécifique, ce qui conduit à la perméabilisation des membranes mitochondriales et au déclenchement de la mort cellulaire (Kroemer & Reed 2000).

Les gènes codant pour les ANT ont été clonés dans un bon nombre d'espèces telles que la levure, diverses plantes, le
20 bœuf, le rat, la souris et l'homme. Toutes ces espèces possèdent plusieurs isoformes, et la structure des gènes est hautement conservée avec une organisation en 4 exons séparés par 3 introns. L'ANT humain existe sous trois isoformes (ANT1, ANT2, et ANT3) codées par trois gènes nucléaires différents
25 qui ont été clonés et séquencés. L'ANT1 (chromosome 4) est principalement exprimé dans le cœur et les muscles squelettiques. On connaît une maladie héréditaire chez l'homme liée à une mutation de l'ANT 1 (substitution de l'alanine 114 en proline). Il s'agit de l'ophtalmoplégie progressive
30 externe (affection rare caractérisée par d'importantes

délétions de l'ADN mitochondrial). L'ANT2 (chromosome X) est très faiblement exprimé dans les tissus matures. Les plus forts niveaux d'expression de l'ANT2 sont observés dans les cellules en prolifération telles que les myoblastes et les
 5 cellules tumorales. L'ANT2 est aussi spécifiquement trouvé dans les cellules transformées par le virus SV40, ainsi que les lignées dépourvues d'ADN mitochondrial (rho⁰). L'ANT3 (région pseudoautosomale des chromosomes X et Y) est exprimé de façon ubiquitaire dans tous les tissus différenciés.

10 L'apoptose est un processus de suicide cellulaire qui se déroule en trois phases : une phase pré-mitochondriale (hétérogène), une phase mitochondriale (décision de mort), et une phase de dégradation (« putréfaction » de la cellule). L'ANT, une protéine insérée dans la membrane interne des
 15 mitochondries, a la capacité de former un pore qui change radicalement le rôle de la mitochondrie : lorsque l'ANT est dans son état de PORE OUVERT la mitochondrie devient un organe de destruction de la cellule.

Les points suivants sont aujourd'hui établis :

- 20 • Il est possible de tuer des cellules *in vitro* en induisant la fonction pore de l'ANT (Belzac, Jacotot et al., *Cancer Res.* 2001 Feb 15. 61(4):1260-4).
- Il est possible de protéger des cellules cardiaques *ex vivo* (cœur reperfusé isolé) en bloquant la
 25 fonction pore de l'ANT (Di Lisa et al., *J Biol Chem.* 2000 Nov. 9).
- Il est possible de protéger des neurones *in vivo* de la mort consécutive à l'ischémie cérébrale en inhibant l'ANT (Cao et al., *J Cereb Blood Flow Metab.*
 30 2001 Apr. 21(4):321-333).

L'ANT est donc un point de contrôle majeur de l'apoptose et est régulé par des protéines endogènes comme le suppresseur de tumeur Bax (pro-apoptotique) et l'oncoprotéine Bcl-2 (anti-apoptotique). L'ANT est aussi régulé par des protéines virales

comme Vpr (pro-apoptotique issu du VIH) et vMIA (anti-apoptotique issu du CMV). C'est donc une cible idéale pour lutter contre les dérégulations pathologiques de l'apoptose.

Des données récentes ont révélé que l'ARN double-brin (ARNdb) induit l'extinction de l'expression de gènes dont la séquence est très homologue à la séquence de l'un des deux brins d'ARN du duplex. Ce phénomène, appelé interférence à ARN ou ARNi conduit à la dégradation des ARN messagers (Hammond et al., 2001, Sharp, 2001). Tuschl et coll. ont démontré que l'introduction dans des cellules de mammifères d'un duplex ARN de 21 nucléotides (small interfering RNA ou ARNsi) conduit à l'inhibition spécifique de l'expression génique (Elbashir et al., 2001). Après transfection, les ARNsi agissent de pair avec des composants cellulaires (l'enzyme DICER et le complexe RISC) afin d'abolir l'expression du gène cible.

Les inventeurs ont constaté qu'il était possible de réguler l'apoptose à des fins thérapeutiques en agissant sur le niveau d'expression des isoformes humaines de l'ANT de manière sélective.

En particulier, il s'est avéré que des ARNi conçus à partir de régions définies de 21 nucléotides de la séquence codante de chaque isoforme de l'ANT a permis d'élaborer des ARNi duplex capables, après transfection, d'abolir sélectivement l'expression de chaque isoforme.

L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux produits qui associés à tout procédé de transfert d'acides nucléiques sont utilisables en thérapeutique humaine et animale.

L'invention vise des ARNi capables d'inhiber sélectivement l'expression d'un isoforme de l'ANT, caractérisés en ce qu'il s'agit de duplex d'ARN, l'un des brins étant hautement homologue d'un fragment de l'ARNm codant pour ledit isoforme de l'ANT.

Avantageusement, les ARNi de l'invention sont des ARNsi (ARN d'interférence de petite taille) de 18 à 25 nucléotides, plus particulièrement de 21 nucléotides.

Des ARNi préférés sont choisis parmi ceux de séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3 :

SEQ ID N°1 : 5'-acagaucagugcugagaagdTdT-3'
 5'-cuucucagcacugaucugudTdT-3'

10 SEQ ID N°2 5'-gcagaucacugcagauaagdTdT-3'
 5'-cuuauucugcagugaucugcdTdT-3'

SEQ ID N°3 5'-gggcaucguggacugcauudTdT-3'
 5'-aaugcaguccacgaugcccdTdT-3'

15

L'invention vise également des constructions contenant au moins un ARNi tel que défini ci-dessus ou des séquences d'ADN codant pour chacun des brins de ces ARNi.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la construction est caractérisée en ce que l'ARNi est associé à un vecteur facilitant son administration, son passage au travers de membranes, tissus ou de téguments biologiques, notamment membranes cytoplasmiques, membranes mitochondriales, membranes nucléaires, la peau, les muqueuses, les parois endothéliales, la barrière hémato-encéphalique, ainsi que sa biodisponibilité, stabilité et sa pharmacodistribution tel qu'un peptide, un liposome, des nanoparticules (nanosphères, nanotubes), un oligomère non naturel tels que des polymères d'urée.

30 Dans un autre mode de réalisation, la construction est caractérisée en ce que l'ARNi est associé à un vecteur permettant le transfert d'acides nucléiques, tels que rétrovirus (Barton and Medzhitov, PNAS, 2002, vol. 99 (23) : p 14943-14945), transposons, adénovirus (Xia et al. ; Nature

Avantageusement, les ARNi de l'invention sont des ARNsi (ARN d'interférence de petite taille) de 18 à 25 nucléotides, plus particulièrement de 21 nucléotides.

Des ARNi préférés sont choisis parmi les duplex avec des
5 brins de séquences SEQ ID N°1 et SEQ ID N°2 ; SEQ ID N°3 et SEQ ID N°4 ; SEQ ID N°5 et SEQ ID N°6 :

SEQ ID N°1: 5'-acagaucagugcugagaagdTdT-3'

SEQ ID N°2: 5'-cuucucagcacugaucugudTdT-3'

10 SEQ ID N°3: 5'-gcagaucacugcagauaagdTdT-3'

SEQ ID N°4: 5'-cuuauucugcagugaucugcdTdT-3'

SEQ ID N°5: 5'-gggcaucguggacugcauudTdT-3'

SEQ ID N°6: 5'-aaugcaguccacgaugcccdTdT-3'

15 L'invention vise également des constructions contenant au moins un ARNi tel que défini ci-dessus ou des séquences d'ADN codant pour chacun des brins de ces ARNi.

Dans un mode de réalisation de l'invention, la construction est caractérisée en ce que l'ARNi est associé à
20 un vecteur facilitant son administration, son passage au travers de membranes, tissus ou de téguments biologiques, notamment membranes cytoplasmiques, membranes mitochondriales, membranes nucléaires, la peau, les muqueuses, les parois endothéliales, la barrière hémato-encéphalique, ainsi que sa
25 biodisponibilité, stabilité et sa pharmacodistribution tel qu'un peptide, un liposome, des nanoparticules (nanosphères, nanotubes), un oligomère non naturel tels que des polymères d'urée.

Dans un autre mode de réalisation, la construction est
30 caractérisée en ce que l'ARNi est associé à un vecteur permettant le transfert d'acides nucléiques, tels que rétrovirus (Barton and Medzhitov, PNAS, 2002, vol. 99 (23) : p 14943-14945), transposons, adénovirus (Xia et al. ; Nature

Bidech, 2002, Vol. 20, p1005-1010), plasmides (Brummelkamp et al., Cancel Call, 2002, p 243-247.

L'invention vise en outre les compositions pharmaceutiques caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un ARNi tel que défini ci-dessus, ou une construction telle que définie plus haut, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Des compositions pharmaceutiques avantageuses sont caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme injectable.

D'autres formes de présentation sont adaptées à l'administration par voie orale, parentérale, rectale ou topique (Levis et al., Nature Genetics, 2002, vol. 32, p107-108).

Les ARNi, constructions ou compositions pharmaceutiques tels que définis ci-dessus sont caractérisés en ce qu'ils ont la capacité de réguler (induire ou inhiber) la perméabilisation des membranes mitochondriales et la mort cellulaire de type apoptotique, nécrotique, autophagique et mécanismes apparentés.

Les compositions de l'invention permettent la régulation de l'expression des isoformes humaines de l'ANT et à ce titre sont particulièrement utiles pour le traitement de pathologies liées à des dérégulations de l'apoptose et des autres formes de mort cellulaire apparentées.

L'invention concerne donc en partie l'utilisation des ARNsi-ANT1, ARNsi-ANT2, ANRsi-ANT3 pour induire/favoriser (ARNsi-ANT2) ou au contraire inhiber (ARNsi-ANT1 et/ou ARNsi-ANT3) la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et l'apoptose et la mort de type apoptotique, nécrotique, autophagique, et mécanismes apparentés.

L'invention concerne donc aussi l'utilisation des ADNc hANT1, hANT2, hANT3 pour induire/favoriser (ADNc hANT1 et/ou

ADNc hANT3) ou au contraire inhiber (CDNA hANT2) la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) et l'apoptose.

On cite en particulier leur application pour traiter un déficit d'apoptose, par exemple dans les différentes formes de cancer, les maladies auto-immunes, telles que lupus érythémateux disséminé, polyarthrites.

Dans d'autres applications, ces compositions sont utilisées pour traiter un excès d'apoptose comme par exemple les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington) et les ischémies cérébrales et cardiaques.

Par exemple, des ARNsi de l'ANT1 ou l'ANT3, ou encore de l'ADNc de l'ANT2 pourront être utilisés pour inhiber la mort neuronale dans des situations d'ischémies ou de pathologies neurodégénératives ou encore pour inhiber la mort de cardiomyocytes dans des situations ischémiques, ou la mort d'hépatocytes (infections virales, intoxications médicamenteuses). Par exemple, des ARNsi h-ANT2 et/ou des ADNc h-ANT1 ou h-ANT3 pourront être utilisés pour induire l'apoptose de cellules tumorales ou de lymphocytes auto-réactifs.

Lesdites compositions pharmaceutiques présentent également un grand intérêt pour le traitement des infections par HIV.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se référant aux figures 1 à 6 qui représentent respectivement :

- Figure 1. Séquences complètes des ADNc codant pour les trois isoformes humaines de l'ANT isolés après RT/PCR à l'aide d'ARNs provenant de cellules 293T et HeLa.
- Figure 2. L'expression des isoformes hANT1 et hANT3 induisent l'apoptose. Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T, 24 heures après cotransfection d'1 μ g de vecteur pIRES-2-eGFP avec 1 μ g de vecteur pcDNA3.1-hANT. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives. B.

Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T, 24, 48 ou 72 heures après transfection avec 1 μ g de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 μ g de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives.. C. Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de noyaux hypoploïdes sur des cellules 293T 24, 48 ou 72h après transfection avec 1 μ g de vecteur pIRES-eGFP ou 1 μ g de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT.

- Figure 3. L'apoptose induite par l'expression de hANT1 et hANT3 est inhibée par ZVAD et Boc D mais pas par CsA. A. Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T 48 après transfection avec 1 μ g de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 μ g de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT en présence ou en absence de 10 μ M de CsA. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives. B. Analyse en cytométrie de flux de cellules 293T 48 heures après transfection avec 1 μ g de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 μ g de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT en présence ou en absence de 100 μ M de ZVAD-fmk ou de 100 μ M de Boc D. La quantification de l'intensité du marqueur CMXRos est réalisée uniquement sur les cellules GFP positives.
- Figure 4. L'expression de Bcl2 inhibe l'apoptose induite par l'expression des isoformes hANT1 et hANT3. Des cellules HeLa Neo et Bcl2 sont transfectées avec 1 μ g de vecteur pIRES-2-eGFP ou avec 1 μ g de chaque vecteur pIRES-eGFP-hANT et après 72 heures l'intensité du marqueur CMXRos est analysée par cytométrie de flux sur les cellules GFP positives.
- Figure 5. Localisation subcellulaire des isoformes hANT1 et hANT2. Des cellules HeLa sont transfectées avec 1 μ g de vecteur pcDNA3.1V5-hANT1 (A) ou avec 1 μ g de vecteur pcDNA3.1V5-hANT2 (B) puis fixées avec du

paraformaldehyde. La colocalisation des protéines de fusion hANT-V5 avec la protéine mitochondriale COX est réalisée par une immunodétection de fluorescence de l'épitope V5 (fluorescence verte) et de la protéine COX (fluorescence rouge). L'image « merge » représente la superposition des fluorescences vertes et rouges montrant la colocalisation.

- Figure 6. Inhibition spécifique de l'expression des isoformes humaines 1 et 2 de l'ANT via l'utilisation de siRNA spécifiques.

(A). Des cellules HeLa sont co-transfectées avec d'une part un vecteur d'expresssion pcDNA3.1V5-hANT1 et d'autre part des ARNsi spécifiques de l' hANT1 ou hANT2mut.

(B) Des Celules HeLa sont co-transfectées avec d'une part un vecteur d'expresssion pcDNA3.1V5-hANT2 et d'autre part des ARNsi spécifiques de l' hANT2 ou hANT2mut.

Après 24 heures après transfection, les cellules sont lysées et l'expression des isoformes de l'ANT est déterminée par Western-blot à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-V5.

Cotransfections : Des cellules HeLa sont cultivées en plaque 6 puits en DMEM/Glutamax-I complémenté avec 10% de sérum de veau fœtal. Après 24 heures, les cellules sont transfectées en ajoutant 3 μ l de lipofectamine 2000 (Invitrogen), 3 μ g d'ARNsi et 1 μ g de vecteur pcDNA3.1V5-hANT1 ou 2 dans du DMEM sans sérum (volume final 500 μ l). Les cellules sont rincées 6 heures après la transfection et maintenues en culture pendant 24, 48 ou 72 heures.

Préparations des extraits cellulaires et Western: Les cellules sont resuspendues dans 100 μ l de tampon de lyse (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 25 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, cocktail d'inhibiteurs de proteases) et centrifugées 10 minutes à 13 000 rpm à 4°C. 10 μ l du surnageant est collecté pour réaliser un test Bradford. Les extraits sont ensuite

analysés en gel SDS-PAGE après dénaturation 3 minutes à 100 °C en présence de tampon SDS-Laemmli. Après transfert les protéines sont révélées avec un anticorps anti-V5 (1/5000, Invitrogen).

5 **Clonage des isoformes humaines d'ANT et réalisation de vecteurs d'expression :** De l'ARN total de cellules 293T et de cellules HeLa a été isolé (TRIZOL protocole) et utilisé dans des expériences de reverse transcription/amplification initiées avec une amorce de type oligodT. Des amorces
10 spécifiques des isoformes humaines de l'ANT (hANT1, hANT2 et hANT3) ont été synthétisées à partir des séquences publiées dans GenBank afin d'amplifier spécifiquement l'ADNc complet de chacune des isoformes (Table1). Ces produits ont été ensuite sous-clonés dans le vecteur pGEM-T après l'ajout d'un résidu
15 dAdénosine à leurs extrémités. La séquence de chaque insert a été vérifiée (Figure 1). Les ADNcs codant pour les trois isoformes ont ensuite été clonés dans des vecteurs d'expression : pCDNA3.1 (version +, Invitrogen) et pIRES-2-eGFP (Clontech). Afin de générer des protéines de fusion avec
20 l'épitope V5 correspondant aux trois isoformes, une approche d'amplification (Table 2) a permis de modifier les extrémités des ADNcs codant pour les trois isoformes (mutation du codon STOP et également ajout de séquences de reconnaissance d'enzymes de restrictions) et de sous cloner ces produits
25 dans le vecteur pCDNA3.1-V5 (versionA, Invitrogen). Les constructions finales ont été vérifiées par séquençage.

Potentiel apoptotique des isoformes humaines de l'ANT :
Les expériences de transfection ont été réalisées sur des cellules 293T en utilisant le vecteur pIRES-2-GFP vide comme
30 control ou les vecteurs pIRES-2-eGFP contenant les séquences des ADNcs codant pour les trois isoformes de l'hANT. A un temps donné post-transfection les cellules ont été analysées par cytométrie de flux.

Les résultats montrent que l'expression des isoformes hANT1 et hANT2 conduit à une dissipation du potentiel mitochondrial déclenchant ainsi l'apoptose alors que l'expression de l'isoforme hANT2 n'affecte pas l'intégrité mitochondriale (Figure 2).

En utilisant une approche expérimentale similaire nous démontrons que l'apoptose liée à l'expression des isoformes hANT1 et hANT3 est inhibée par des inhibiteurs des caspases (ZVAD et Boc D) (figure 3A) mais pas par la Cyclosporine A (CsA) (Figure 3B).

Nous démontrons également, en utilisant des cellules HeLa surexprimant la protéine Bcl2 que cette dernière est capable d'inhiber l'apoptose induite par les isoformes hANT1 et hANT2 (figure 4)

Localisation subcellulaire des isoformes hANT1 et hANT2 :
Après transfection de cellules HeLa avec des constructions codant pour les protéines de fusion hANT1-V5 et hANT2-V5 nous avons réalisé un immunomarquage afin de déterminer la localisation subcellulaire de hANT1 et hANT2. L'analyse de la localisation du signal obtenu avec un anticorps anti-V5 et le signal obtenu avec un anticorps dirigé contre COX (une protéine mitochondriale) met en évidence une localisation mitochondriale des isoformes hANT1 et 2 (figure 5).

Duplex ARNi des isoformes humaines de l'ANT

Préparation des ARNi. Les ARNsi double-brins correspondant aux séquences d'ADNc ANT1 humaine (AAACAGATCAGTGCTGAGAAG, nucléotides 127-147), ANT2 humaine (AAGCAGATCACTGCAGATAAG, nucléotides 127-147), Ant2 humaine contenant quatre mutations (AAGCGGATCGCTACAATAAG, nucléotides 127-147) et Ant3 humaine (AAGGGCATCGTGGACTGCATT, nucléotides 154-174) ont été conçues selon les recommandations de Elbashir et al. (2001). Les duplex ont été réalisés par Proligo (France).

hANT1 (127-147)

Séquence d'ADN: 5'-aaacagatcagtgctgagaag-3'
 Duplex ARNi: 5'-acagaucagugcugagaagdTdT-3'
 5 5'-cuucucagcacugaucugudTdT-3'

hANT2 (127-147)

Séquence ADN: 5'-aagcagatcactgcagataag-3'
 10 Duplex ARNi: 5'-gcagaucacugcagauaagdTdT-3'
 5'-cuuauucugcagugaucugcdTdT-3'

hANT2mut (127-147)

15 Séquence ADN: 5'-aagcggatcgctacaaataag-3'
 Duplex ARNi: 5'-gcggaucgcuacaaauaagdTdT-3'
 5'-cuuauuuguagcgauccgcdTdT-3'

hANT3 (154-174)

20 Séquence ADN: 5'-aagggcatcgtggactgcatt-3'
 Duplex ARNi: 5'-gggcaucguggacugcauudTdT-3'
 25 5'-aaugcaguccacgaugcccdTdT-3'

Dans les tableaux ci-après, on rapporte respectivement les séquences des amorces utilisées :

- Tableau 1 : lors des expériences de RT/PCR afin de cloner l'ADNc codant pour les trois isoformes humaines de l'ANT.
- Tableau 2 : pour la construction des vecteurs d'expression contenant les ADNcs codant pour les protéines de fusion hANT-V5.

hANT1 (127-147)

5 Séquence d'ADN: 5'-aaacagatcagtgcctgagaag-3' (SEQ ID N°7)
 Duplex ARNi: 5'-acagaucagugcugagaagdTdT-3' (SEQ ID N°8)
 5'-cuucucagcacugaucugudTdT-3' (SEQ ID N°9)

hANT2 (127-147)

10 Séquence ADN: 5'-aagcagatcactgcagataag-3' (SEQ ID N°10)
 Duplex ARNi: 5'-gcagaucacugcagauaagdTdT-3' (SEQ ID N°11)
 5'-cuuauucugcagugaucugcdTdT-3' (SEQ ID N°12)

hANT2mut (127-147)

15 Séquence ADN: 5'-aagcggatcgctacaataag-3' (SEQ ID N°13)
 Duplex ARNi: 5'-gcggaucgcuacaaauaagdTdT-3' (SEQ ID N°14)
 5'-cuuauuuguagcgauccgcdTdT-3' (SEQ ID N°15)

hANT3 (154-174)

25 Séquence ADN: 5'-aagggcatcgctggactgcatt-3' (SEQ ID N°16)
 Duplex ARNi: 5'-gggcaucguggacugcauudTdT-3' (SEQ ID N°17)
 5'-aaugcaguccacgaugcccdTdT-3' (SEQ ID N°18)

Dans les tableaux ci-après, on rapporte respectivement les séquences des amorces utilisées :

- 30
- Tableau 1 : lors des expériences de RT/PCR afin de cloner l'ADNc codant pour les trois isoformes humaines de l'ANT.
 - Tableau 2 : pour la construction des vecteurs d'expression contenant les ADNcs codant pour les protéines de fusion hANT-V5.

Références :

- Hammond, S. M., Caudy, A. A. and Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet*, 2, 110-119.
- Sharp, P.A. (2001). RNA interference-2001. *Genes Dev.* 15, 485-490.
- 10 Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-498.

	Forward Primer	Reverse Primer
hANT1	5'ATGGGTGATCAGCTTGGAGCTTCCTAAAG3'	5'TTAGACATATTTTTTGGATCTCATCATACAA3'
hANT2	5'ATGACAGATGCCGCTGTGCTCCTTCGCCAAG3'	5'TTATGTGTACTTCTTGATTTCATCATACAA3'
hANT3	5'ATGACGGAAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA3'	5'TTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTGTACAG3'

Table 1

Amorce sens		Amorce antisens	
hANT1 (SEQ ID N° 22 et 23)	5'ATGGGTGATCACGCTTGGAGCTTCCTAAAG3'	5'TTAGACATATTTTTTGATCTCATCATACAA3'	
hANT2 (SEQ ID N° 24 et 25)	5'ATGACAGATGCCGCTGTGTCCTTCGCCAAG3'	5'TTATGTGTACTTCTTGATTTCATCATACAA3'	
hANT3 (SEQ ID N° 26 et 27)	5'ATGACGGAACAGGCCATCTCCTTCGCCAAA3'	5'TTAGATCACCTTCTTGAGCTCGTCGTACAG3'	

Table 1

	Forward Primer	Reverse Primer
hANT1	5'TAAGGTACCATGGGTGATCACGCTTGGAG3'	5'ATCTCGAGGACATATTTTGGATCTC3'
hANT2	5'TAAGGTACCATGACAGATGCCGCTGTGT3'	5'ATCTCGAGTGTGTACTTCTTGATTTC3'
hANT3	5'TAAGGTACCATGACGGAACAGGCCATCT3'	5'ATCTCGTGGATCACCTTCTTGAGCTC3'

Table 2

	Amorce sens		Amorce antisens
hANT1	5'TAAGGTACCATGGGTGATCACGCTTGGG3'	(SEQ ID N°28 et 29)	5'ATCTCGAGGACATATTTTGGATCTC3'
hANT2	5'TAAGGTACCATGACAGATGCCGCTGTGT3'	(SEQ ID N°30 et 31)	5'ATCTCGAGTGTGTACTTCTTGGATTTTC3'
hANT3	5'TAAGGTACCATGACGGGACAGGCCCATCT3'	(SEQ ID N°32 et 33)	5'ATCTCGTGGATCACCTTCTTGAGCTC3'

Table 2

REVENDICATIONS

1/ ARNi capables d'inhiber sélectivement l'expression
5 d'une isoforme de l'ANT, caractérisés en ce qu'il s'agit d'un
duplex d'ARN, l'un des brins étant hautement homologue d'un
fragment de l'ARNm codant pour ledit isoforme de l'ANT.

2/ ARNi selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il
s'agit d'un ARNsi de 18 à 25 nucléotides, plus
10 particulièrement de 21 nucléotides.

3/ ARNi selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il
présente la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 ou SEQ ID N°3.

4/ Construction contenant au moins un ARNi selon l'une
quelconque des revendications 1 à 3, ou des séquences d'ADN
15 codant pour chacun des brins de ces ARNi.

5/ Construction selon la revendication 4, caractérisée en
ce que l'ARNi est associé à un vecteur facilitant facilitant
son administration, son passage au travers de membranes,
tissus ou de téguments biologiques, notamment membranes
20 cytoplasmiques, membranes mitochondriales, membranes
nucléaires, la peau, les muqueuses, les parois endothéliales,
la barrière hémato-encéphalique, ainsi que sa
biodisponibilité, sa stabilité et sa pharmacodistribution tel
qu'un peptide, un liposome, des nanoparticules (nanosphères,
25 nanotubes), un oligomère non naturel tels que des oligomères
d'urée.

6/ Construction selon la revendication 4, caractérisée en
ce qu'il s'agit de vecteurs permettant le transfert d'acides
nucléiques, tels que rétrovirus, transposons, adénovirus,
30 plasmides.

7/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce
qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un ARNi
selon l'une quelconque des revendications 1. à 3, ou une

REVENDICATIONS

1/ ARNi capable d'inhiber sélectivement l'expression d'une isoforme de l'ANT, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un duplex
5 d'ARN, l'un des brins étant hautement homologue d'un fragment de l'ARNm codant pour une isoforme de l'ANT, les brins du duplex contenant de 18 à 25 nucléotides, plus particulièrement 21 nucléotides.

2/ ARNi selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il
10 présente la séquence SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°6.

3/ Construction contenant au moins un ARNi selon la revendication 1 ou 2, ou des séquences d'ADN codant pour chacun des brins l'ARNi.

15 4/ Construction selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'ARNi est associé à un vecteur facilitant son administration, son passage au travers de membranes, tissus ou de téguments biologiques, notamment membranes cytoplasmiques, membranes mitochondriales, membranes nucléaires, la peau, les
20 muqueuses, les parois endothéliales, la barrière hémato-encéphalique, ainsi que sa biodisponibilité, sa stabilité et sa pharmacodistribution tel qu'un peptide, un liposome, des nanoparticules (nanosphères, nanotubes), un oligomère non naturel tels que des oligomères d'urée.

25 5/ Construction selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'il s'agit de vecteurs permettant le transfert d'acides nucléiques, tels que rétrovirus, transposons, adénovirus, plasmides.

30 6/ Compositions pharmaceutiques, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace d'au moins un ARNi selon la revendication 1 ou 2, ou une construction selon l'une quelconque des revendications 3 à 5, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

construction selon l'une quelconque des revendications 4 à 6, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

8/ Compositions pharmaceutiques, selon la revendication 7, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme injectable, ou administrable par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

9/ ARNi selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, ou constructions selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, ou compositions pharmaceutiques selon la revendication 7 ou 8, caractérisés en ce qu'ils ont la capacité de réguler (induire ou inhiber) la perméabilisation des membranes mitochondriales et la mort cellulaire de type apoptotique, nécrotique, autophagique et mécanismes apparentés.

7/- Compositions pharmaceutiques, selon la revendication 6, caractérisées en ce qu'elles se présentent sous forme injectable, ou administrable par voie orale, parentérale, rectale ou topique.

1/11

Figure 1

hANT 1 sequence :

5
atgggtgatcacgcttggagcttcctaaaggacttcctggccggggcggtcgccgctgccgt
ctccaagaccgcggtcgcccccatcgagaggggtcaaactgctgctgcaggtccagcatgcca
gcaaacagatcagtgctgagaagcagtaaaaaggatcattgattgtgtgggtgagaatccct
aaggagcagggcttcctctccttctggaggggtaacctggccaacgtgatccgttacttccc
10 caccacaagctctcaacttcgccttcaaggacaagtacaagcagctcttcttaggggggtgtgg
atcggcataaagcagttctggcgctactttgctggtaacctggcggtccgggtggggccgctggg
gccacctccctttgctttgtctaccgctggactttgctaggaccaggttggctgctgatgt
gggcaggcgcgcccagcgtgagttccatgggtctgggcgactgtatcatcaagatcttcaagt
ctgatggcctgaggggggtctaccaggggtttcaacgtctctgtccaaggcatcattatctat
15 agagctgcctacttcggagttctatgatactgccaaggggatgctgcctgaccccaagaacgt
gcacattttttgtgagctggatgattgcccagagtggtgacggcagtcgcaggggtgctgtcct
acccctttgacactgttcgtcgtagaatgatgatgcagtcgggcccgaaggggccgatatt
atgtacacggggacagttgactgctggaggaagattgcaaaagacgaaggagccaaggcctt
cttcaaagggtgcctgggtccaatgtgctgagaggcatgggcggtgcttttgtattggtgtgt
20 atgatgagatcaaaaaatatgtctaa

hANT 2 sequence :

25 atgacagatgccgctgtgtccttcgccaaggacttcctggcaggtggagtgccgcagccat
ctccaagacggcggttagcgccccatcgagcgggtcaagctgctgctgcaggtgcagcatgcca
gcaagcagatcactgcagataagcaataaaaaggcattatagactgctgtgggtccgtattccc
aaggagcagggagtctgtccttctggcgcggttaacctggccaatgtcatcagataacttccc
caccagggtctttaacttcgccttcaaagataaatacaagcagatcttcctgggtgggtgtgg
30 acaagagaacccagttttggcgctactttgcagggaatctggcatcggtgggtgccgcaggg
gocacatccctgtgttttgtgtaccctcttgattttgcccgtaccgctctagcagctgatgt
gggtaaagctggagctgaaagggaattccgaggcctcggtgactgcctgggttaagatctaca
aatctgatgggattaagggcctgtaccaaggctttaacgtgtctgtgcaggggtattatcatc
taccgagccgcctacttcggtatctatgacactgcaaagggaatgcttccggatcccaagaa

Figure 1**hANT 1 sequence (SEQ ID N°19) :**

atgggtgatcacgcttggagcttcctaaaggacttcctggccggggcggtcgccgctgccgt
ctccaagaccgcggtcgccccatcgagaggggtcaaactgctgctgcaggtccagcatgcc
gcaaacagatcagtgctgagaagcagtacaaagggatcattgattgtgtgggtgagaatccct
aaggagcagggcttcctctccttctggaggggtaacctggccaacgtgatccgttacttccc
cacccaagctctcaacttcgccttcaaggacaagtacaagcagctcttcttaggggggtgtgg
atcggcataagcagttctggcgctactttgctggtaacctggcgctccggtggggccgctggg
gccacctccctttgctttgtctacctcgctggactttgctaggaccaggttggctgctgatgt
gggcaggcgcgcccagcgtgagttccatggctctgggcgactgtatcatcaagatcttcaagt
ctgatggcctgagggggctctaccaggggttcaacgtctctgtccaaggcatcattatctat
agagctgcctacttcggagtctatgatactgccaaagggtgctgcctgaccccaagaacgt
gcacatTTTTgtgagctggatgattgccagagtgtgacggcagtcgcagggctgctgtcct
accttttgacactgttcgtcgtagaatgatgatgcagtcgggccggaaaggggccgatatt
atgtacacggggacagttgactgctggaggaagattgcaaaagacgaaggagccaaggcctt
cttcaaagggtgcctgggtccaatgtgctgagaggcatgggcggtgcttttgtattggtgttgt
atgatgagatcaaaaaatatgtctaa

hANT 2 sequence (SEQ ID N°20) :

atgacagatgccgctgtgtccttcgccaaaggacttcctggcaggtggagtgccgcagccat
ctccaagacggcggttagcgcccatcgagcgggtcaagctgctgctgcaggtgcagcatgcc
gcaagcagatcactgcagataagcaatacaaaaggcattatagactgcgtgggtccgtattccc
aaggagcagggagttctgtccttctggcgcggttaacctggccaatgtcatcagatacttccc
cacccaggctcttaacttcgccttcaaagataaatacaagcagatcttcctgggtgggtgtgg
acaagagaacccagttttggcgctactttgcagggaatctggcatcggggtgggtgccgcaggg
gccacatccctgtgttttgtgtaccctcttgattttgcccgtagccgtctagcagctgatgt
gggtaaagctggagctgaaaggggaattccgaggcctcggtgactgcctgggttaagatctaca
aatctgatgggattaagggcctgtaccaaggctttaaactgtgtctgtgcaggggtattatcatc
taccgagccgcctacttcggtatctatgacactgcaaaggggaatgcttccggatcccaagaa
cactcacatcgtcatcagctggatgatcgcacagactgtcactgctgttgccgggttgactt

cactcacatcgtcatcagctggatgatcgcacagactgtcactgctgttgccgggttgactt
 cctatccatttgacaccgttcgccgccgcatgatgatgcagtcagggcgcaaaggaactgac
 atcatgtacacaggcacgcttgactgctggcggaagattgctcgtgatgaaggaggcaaagc
 ttttttcaaggggtgcatggtccaatgttctcagaggcatgggtggtgcttttgtgcttgtct
 5 tgtatgatgaaatcaagaagtacacataa .

atgacggaacaggccatctccttcgccaaagacttcttggccggaggcatcgccgcccgc
10 ctccaagacggccgtggctccgatcgagcgggtcaagctgctgctgcaggtccagcacgcca
gcaagcagatcgccgcccagacaagcagtacaagggcatcgtggactgcattgtccgcatcccc
aaggagcagggcgtgctgtccttctggaggggcaaccttgccaacgtcattcgctacttccc
cactcaagccctcaacttcgccttcaaggataagtacaagcagatcttccctggggggcgtgg
acaagcacacgcagttctggaggtactttgcgggcaacctggcctccggcggtgcggccggc
15 ggcacctccctctgcttcgtgtaccgctggatttcgccagaaccgcctggcagcggacgt
gggaaagtccggcacagagcgcgagttccgaggcctgggagactgcctgggtgaagatcacca
agtccgacggcatccggggcctgtaccagggttcagtgtctccgtgcagggcatcatcatc
taccgggcggcctacttcggcgtgtacgatacggccaagggcatgctccccgaccccaagaa
cacgcacatcgtgggtgagctggatgatcgcgacagaccgtgacggccgtggccggcgtgggtgt
20 cctaccccttcgacacgggtgcggcggcgcatgatgatgcagtccgggcgcaaaggagctgac
atcatgtacacgggcaccgtcgactgttggaggaagatcttcagagatgaggggggcaaggc
cttcttcaaggggtgcgtgggtccaacgtcctgcggggcatggggggcgcccttcgtgctgggtcc
tgtacgacgagctcaagaagggtgatctaa

cctatccatttgacaccgttcgccgccgcatgatgatgcagtcagggcgcaaaggaactgac
atcatgtacacaggcacgcttgactgctggcggaagattgctcgtgatgaaggaggcaaagc
ttttttcaaggggtgcatggtccaatgttctcagaggcatgggtgggtgcttttgtgcttgtct
tgtatgatgaaatcaagaagtacacataa

hANT 3 sequence (SEQ ID N°21) :

atgacggaacaggccatctccttcgccaaagacttcttggccggaggcatcgccgccgcat
ctccaagacggcgtggctccgatcgagcgggtcaagctgctgctgcaggtccagcacgcca
gcaagcagatcgccgccgacaagcagtacaagggcatcgtggactgcattgtccgcatcccc
aaggagcagggcgtgctgtccttctggaggggcaaccttgccaacgtcattcgctacttccc
cactcaagccctcaacttcgccttcaaggataagtacaagcagatcttcctggggggcggtgg
acaagcacacgcagttctggagggtactttgcgggcaacctggcctccggcgggtgcggccggc
gcgacctccctctgcttcgtgtacccgctggatttcgccagaacctgcctggcagcggacgt
gggaaagtcaggcacagagcgcgagttccgaggcctgggagactgcctggtgaagatcacca
agtccgacggcatccggggcctgtaccagggttcagtgtctccgtgcagggcattcatcatc
taccggggcggcctacttcggcgtgtacgatacggccaagggcatgctccccgacccaagaa
cacgcacatcgtggtgagctggatgatcgcgacagaccgtgacggccgtggccggcgtggtgt
cctacccttcgacacgggtgcggcggcgcatgatgatgcagtcggggcgcaaaggagctgac
atcatgtacacgggcacccgtcgactgttgagggaagatcttcagagatgaggggggcaaggc
cttcttcaaggggtgcgtggtccaacgtcctgcggggcatggggggcgcccttcgtgctggtcc
tgtacgacgagctcaagaaggtgatctaa

3/11

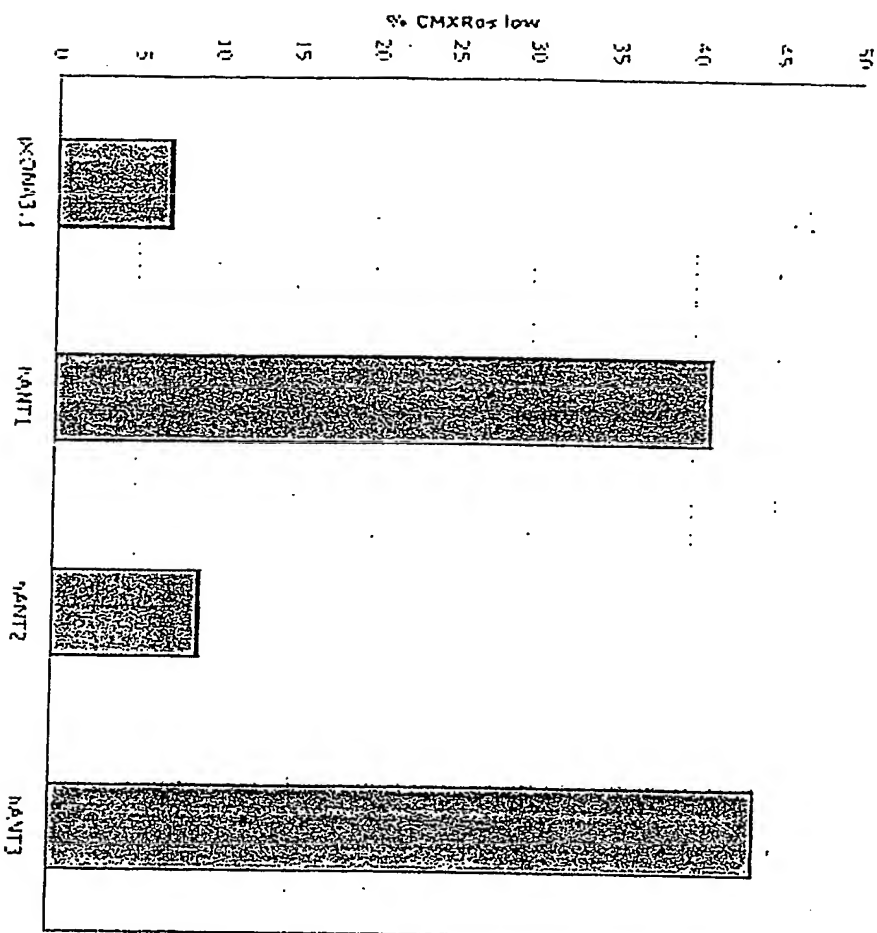


Figure 2A

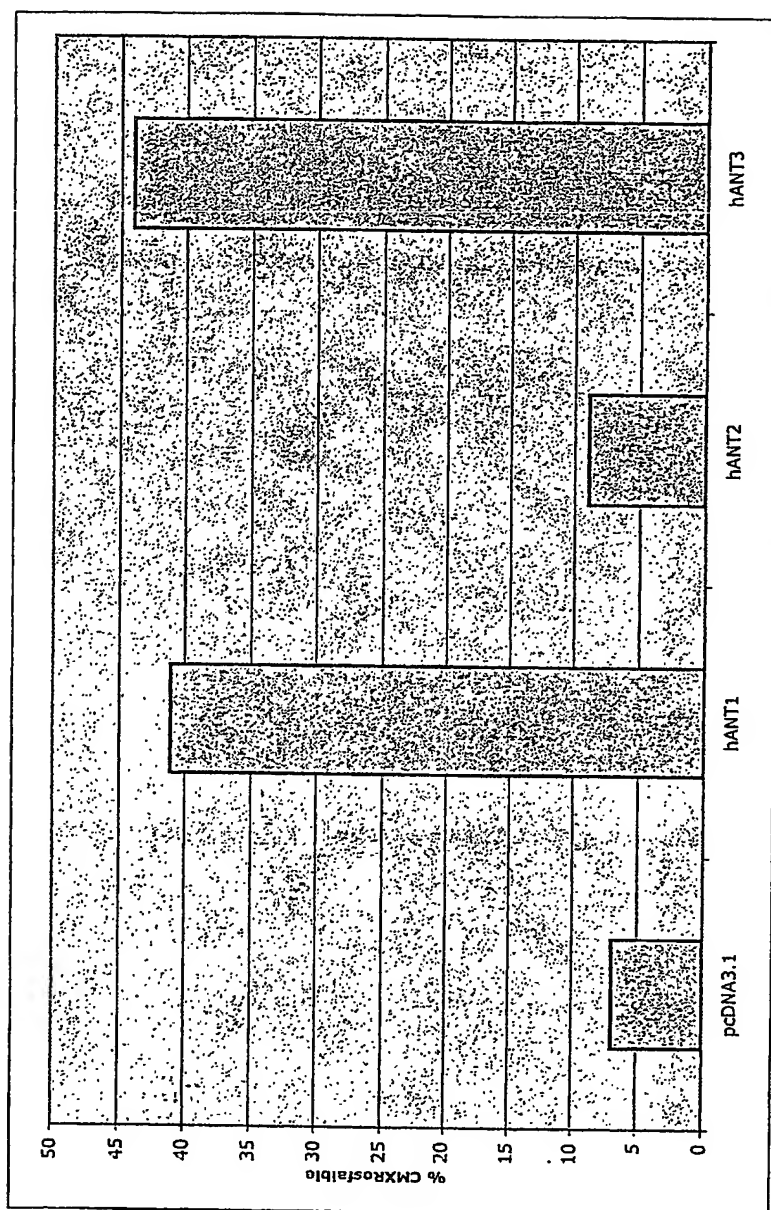


Figure 2A

4/11

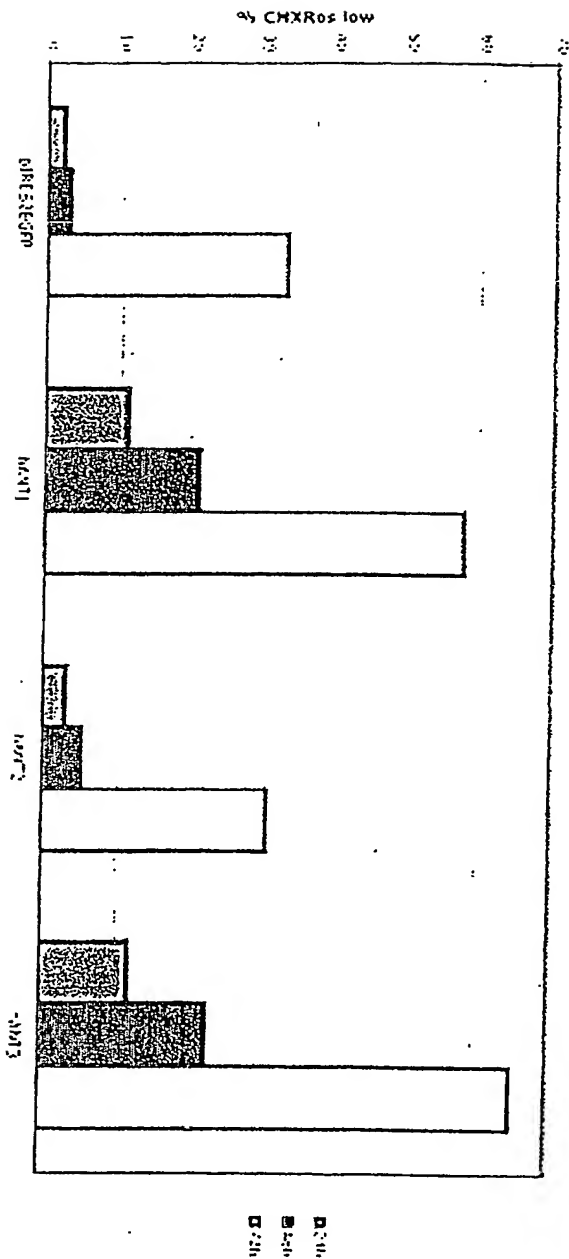


Figure 2B

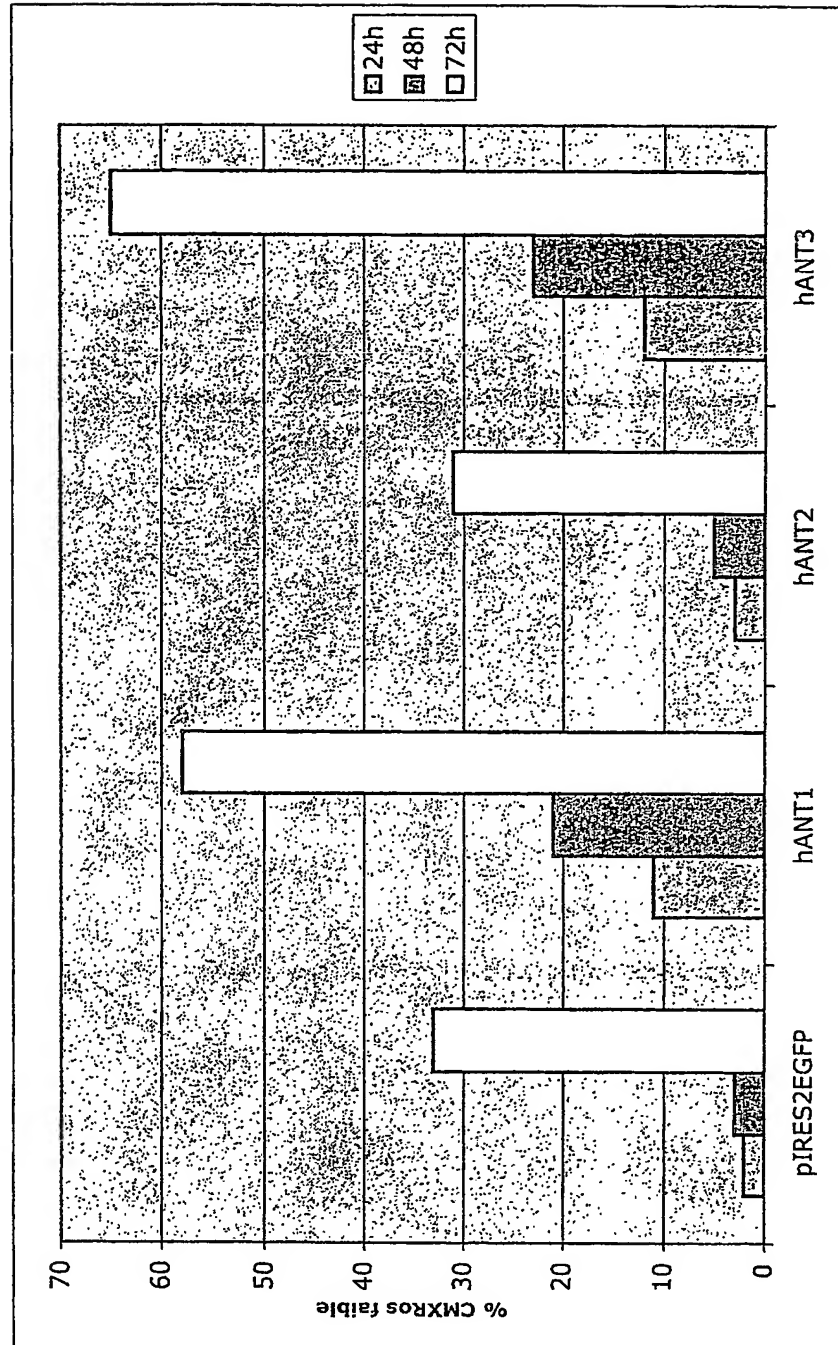


Figure 2B

5/11

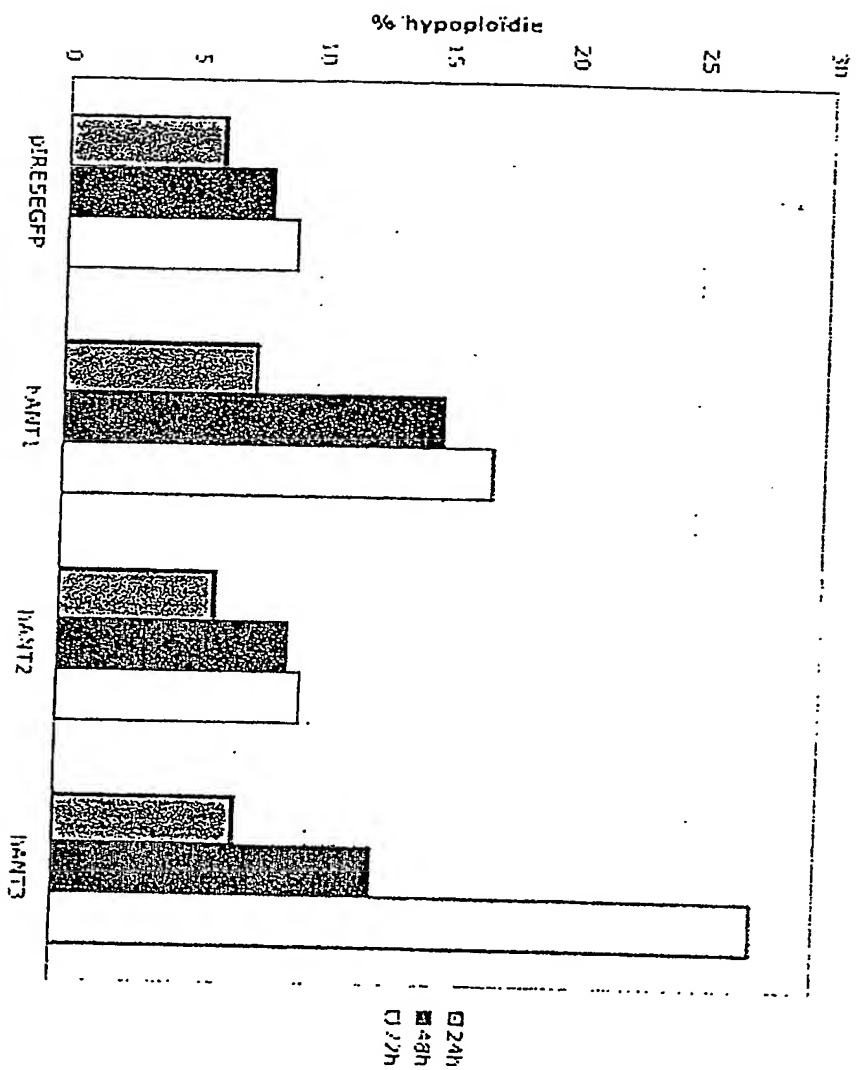


Figure 2C

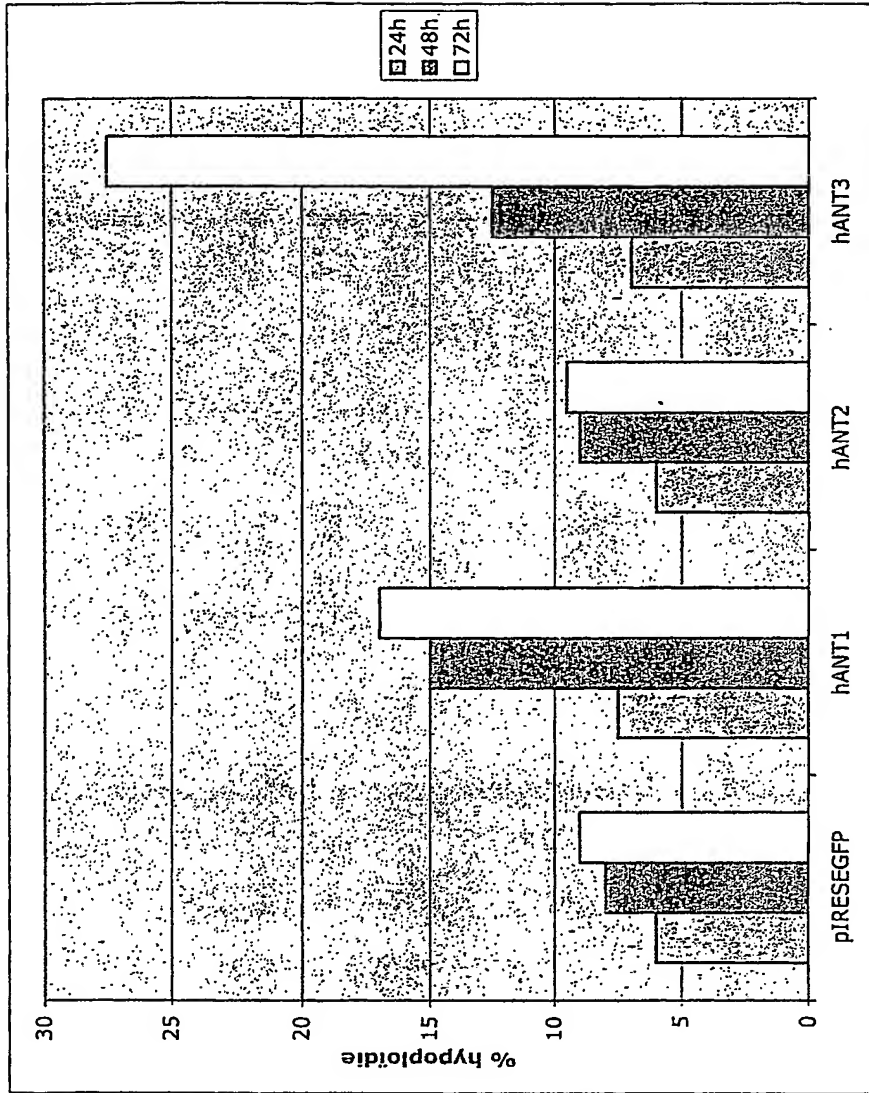


Figure 2C

6/11

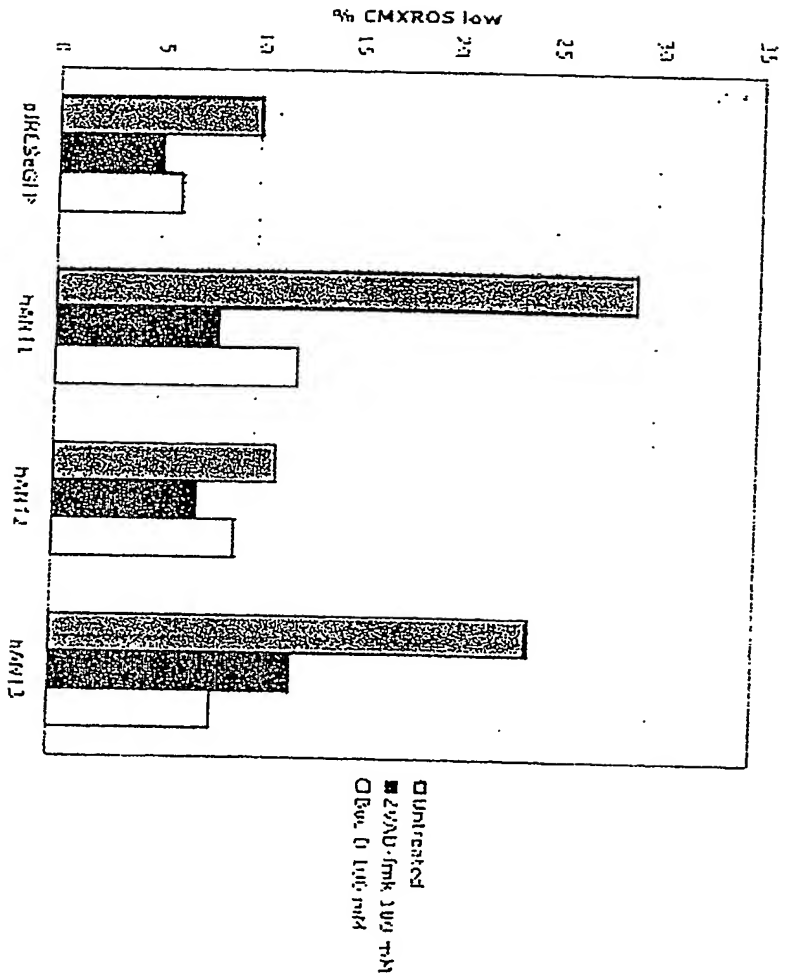


Figure 3A

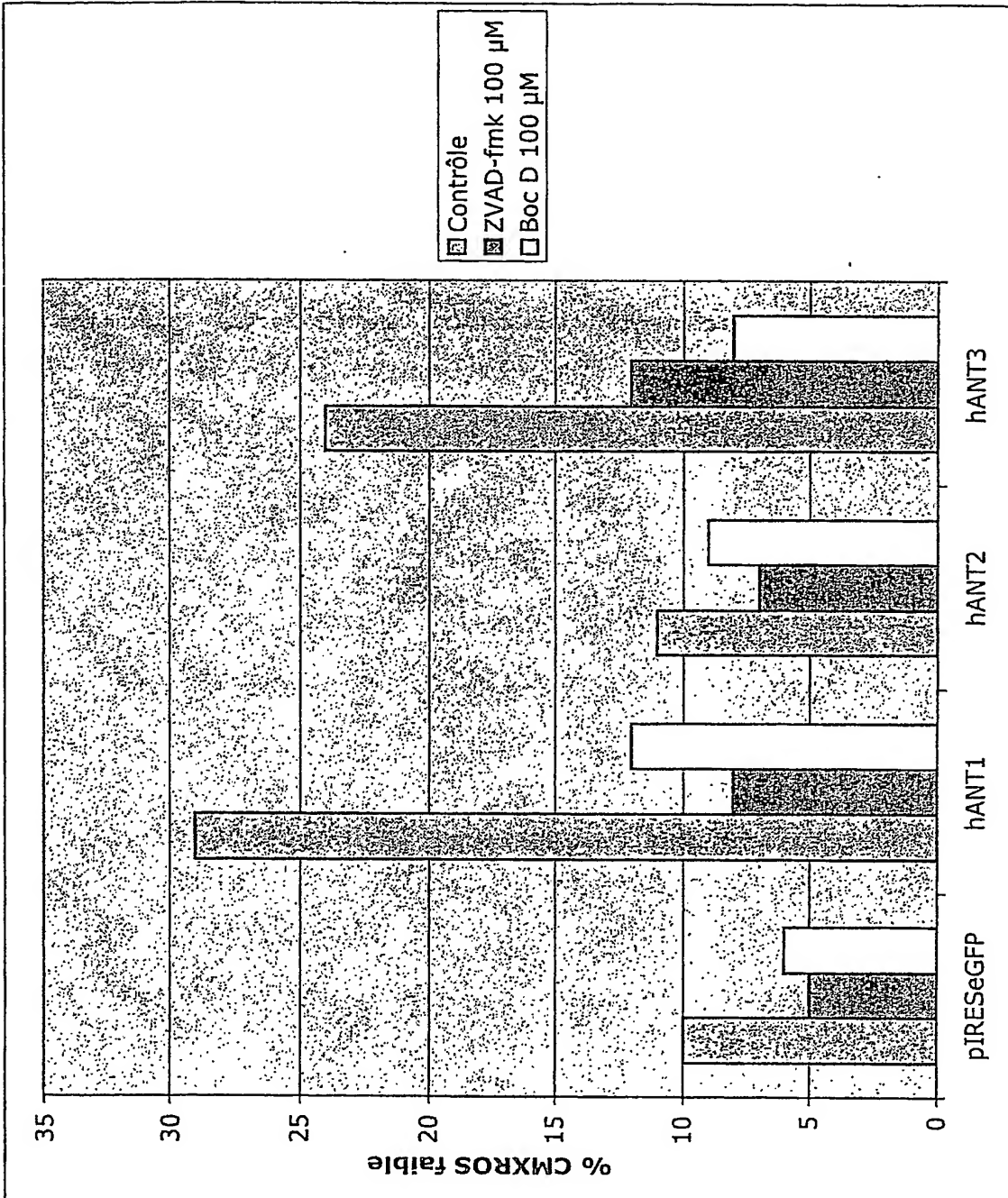


Figure 3A

11/17



Figure 3B

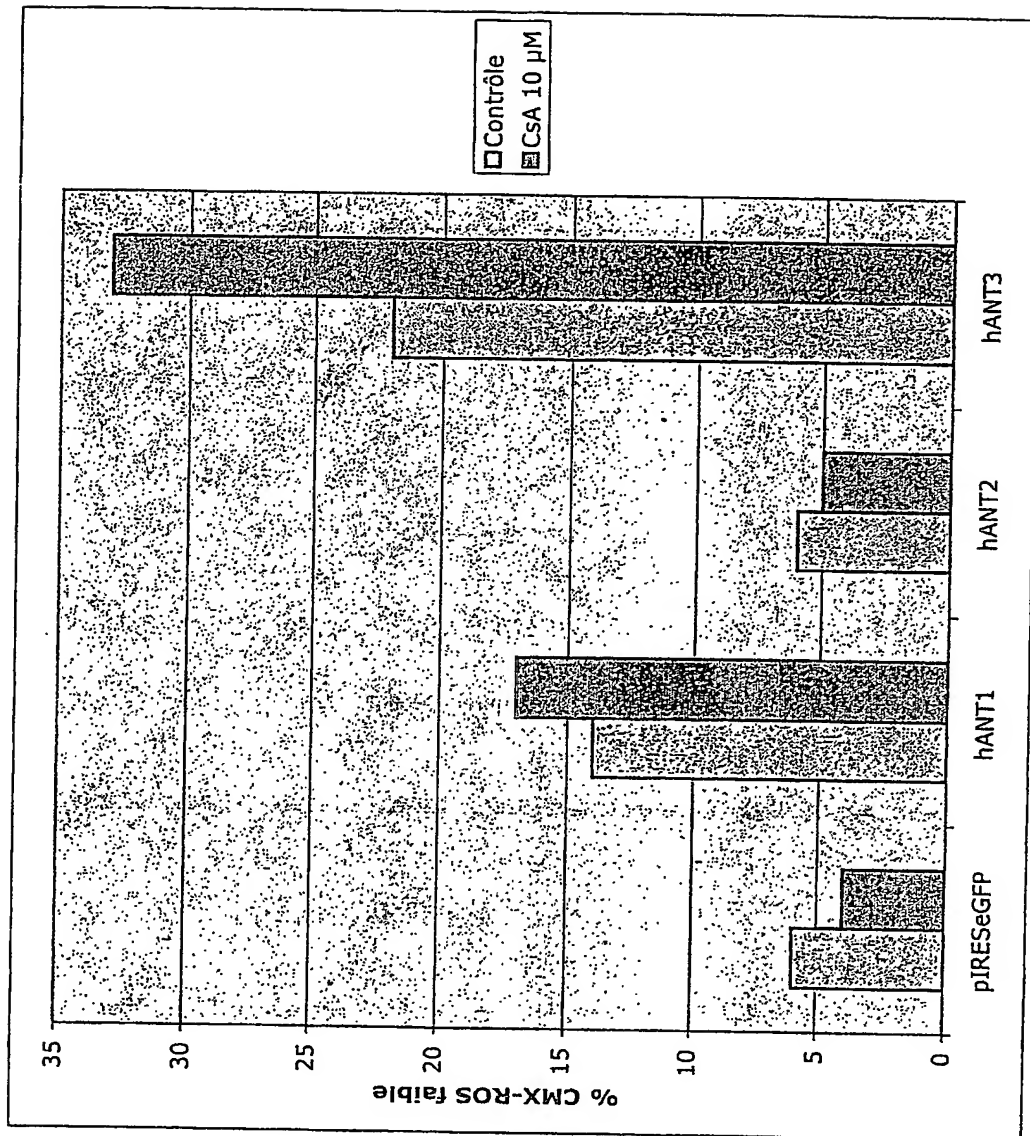


Figure 3B

8/11

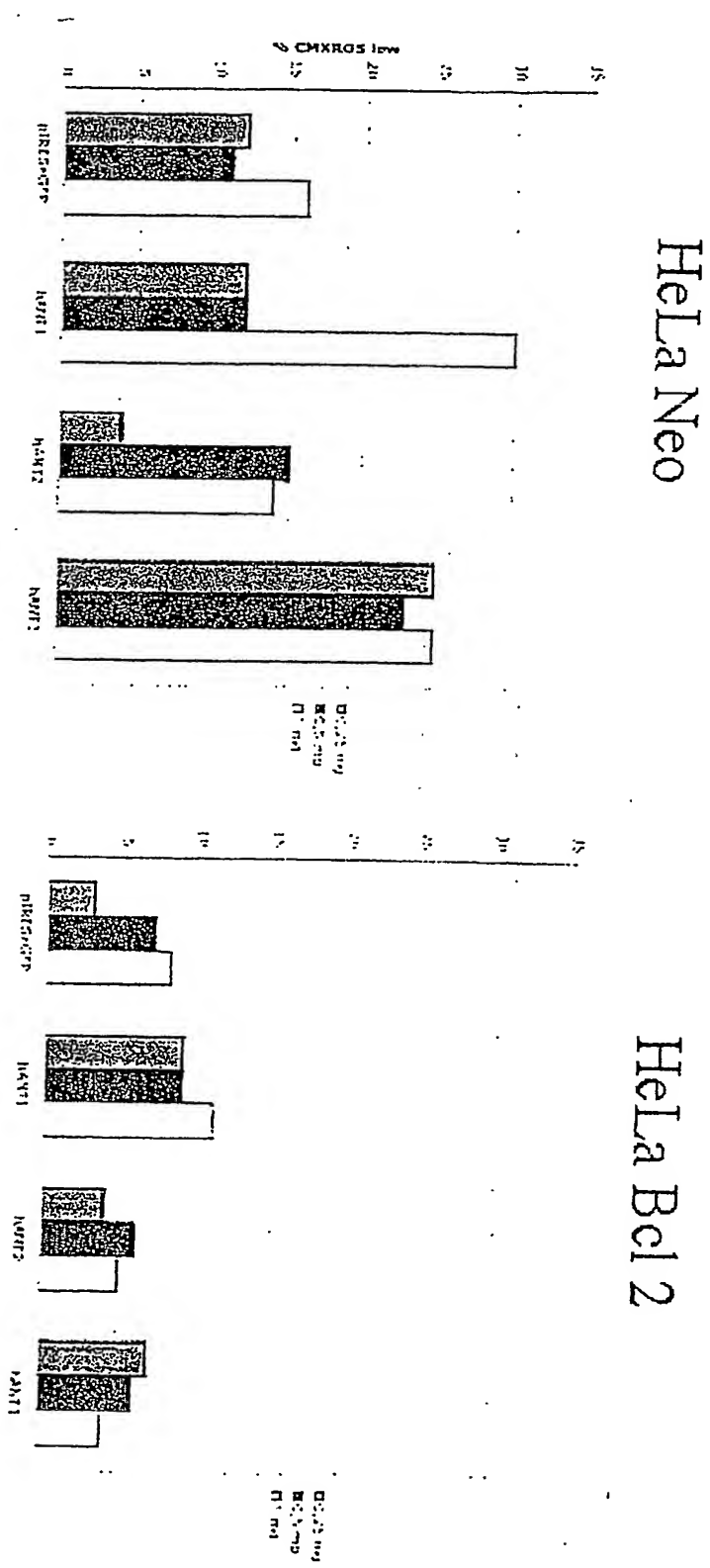
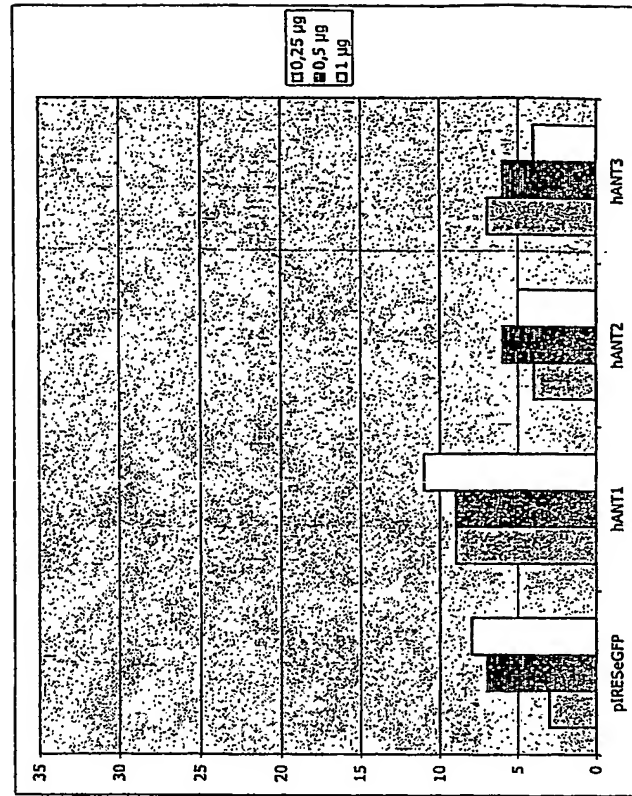


Figure 4

HeLa Bcl 2



HeLa Neo

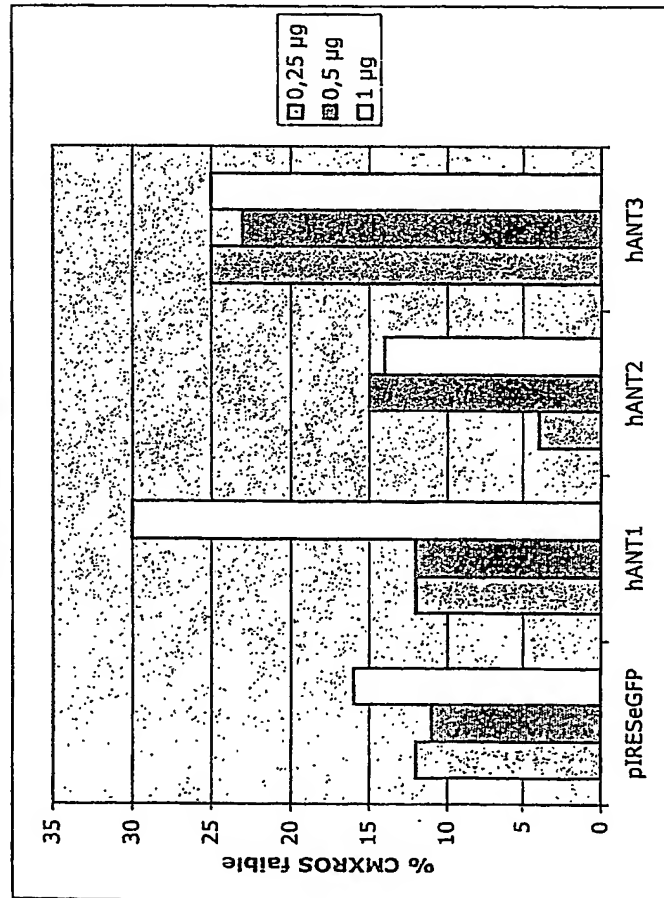


Figure 4

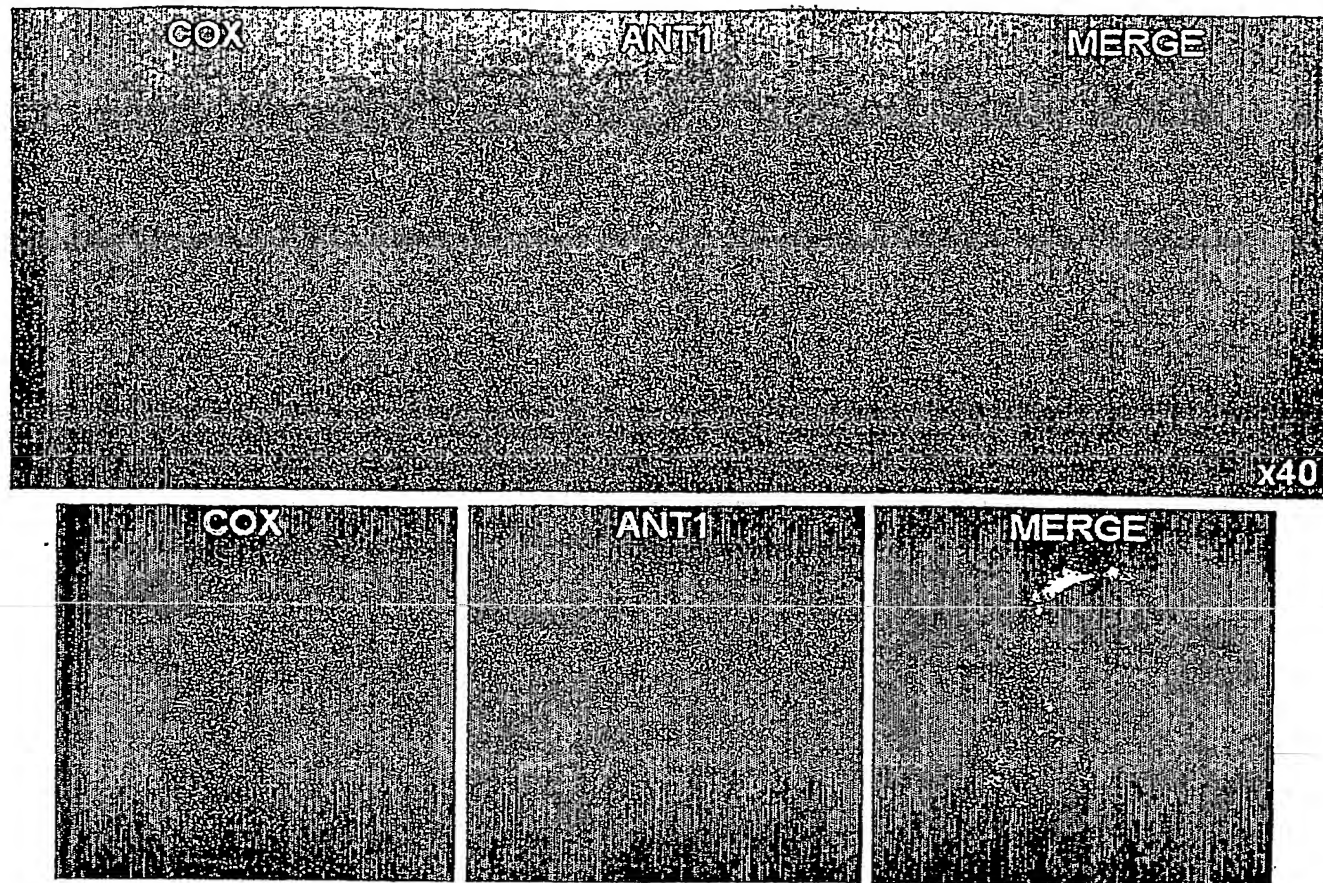


Figure 5A

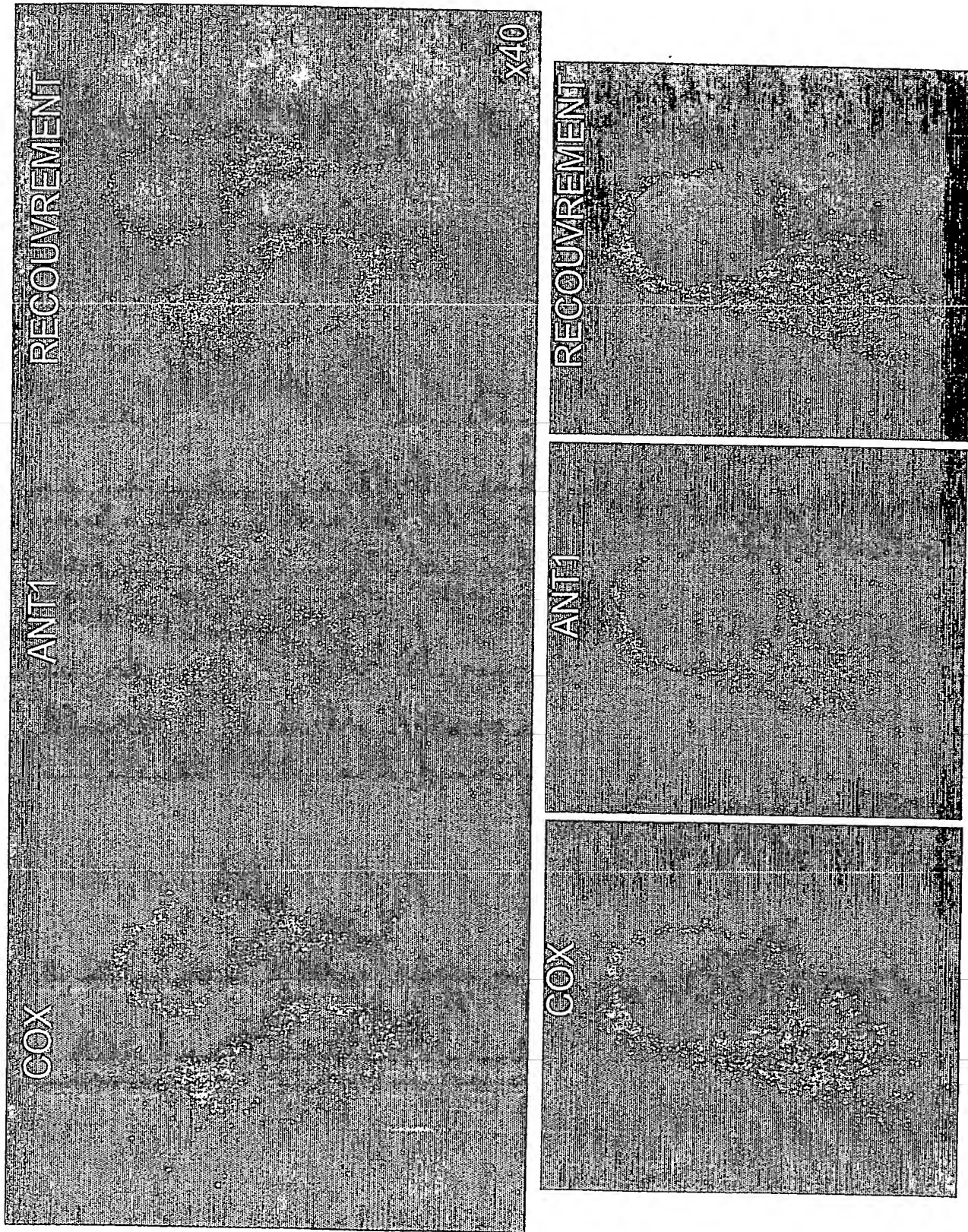


Figure 5A

10/11

10/11/11

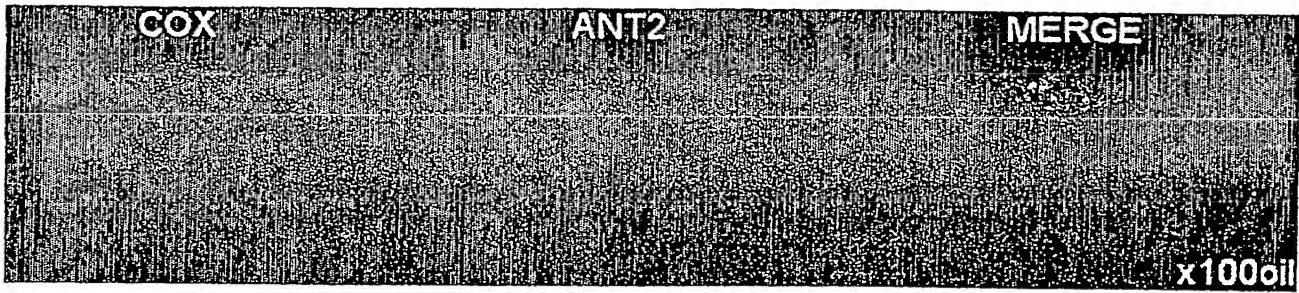
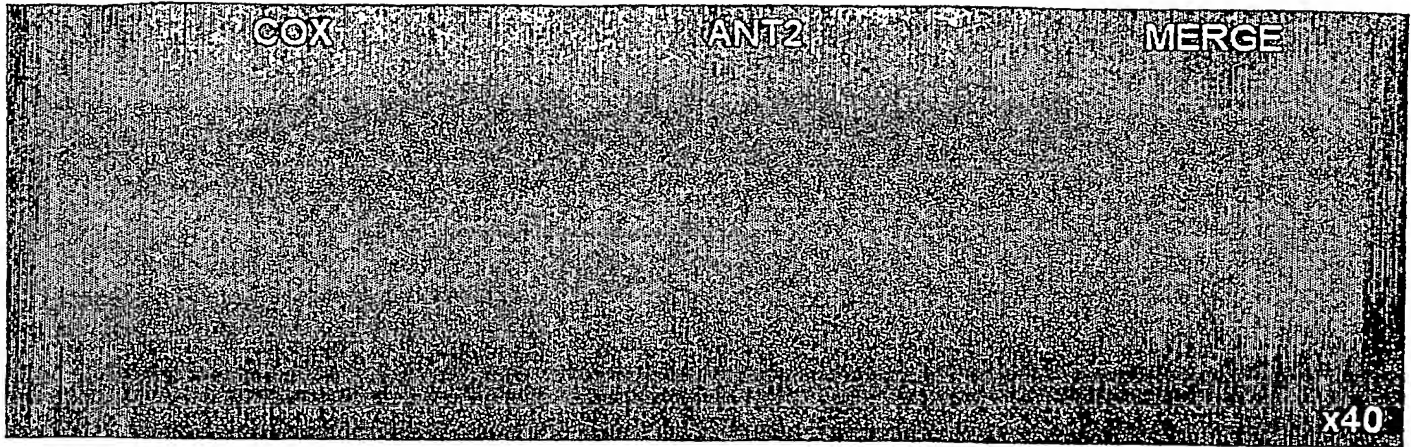


Figure 5B

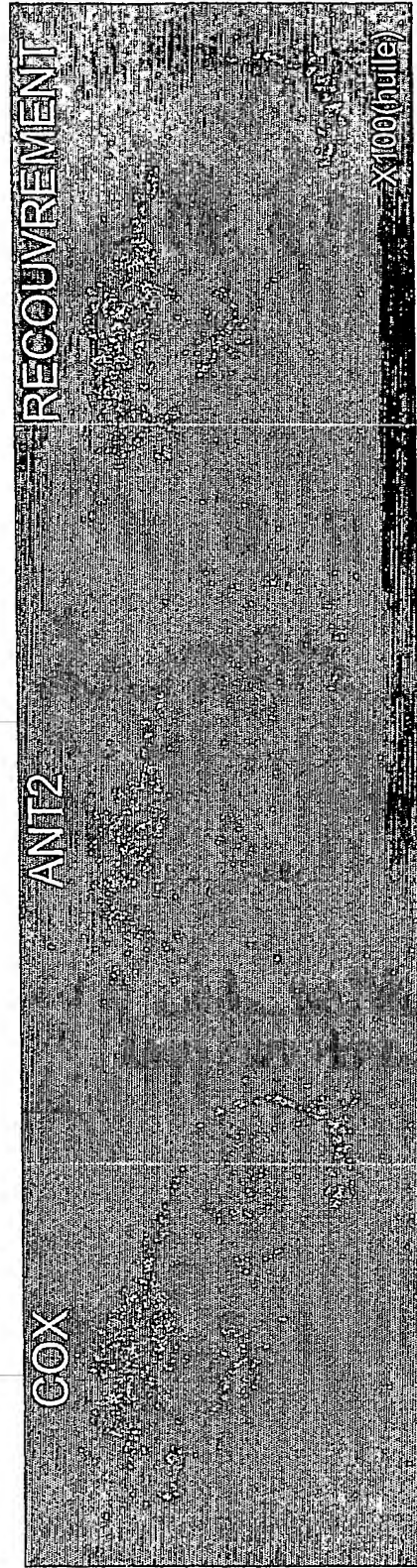
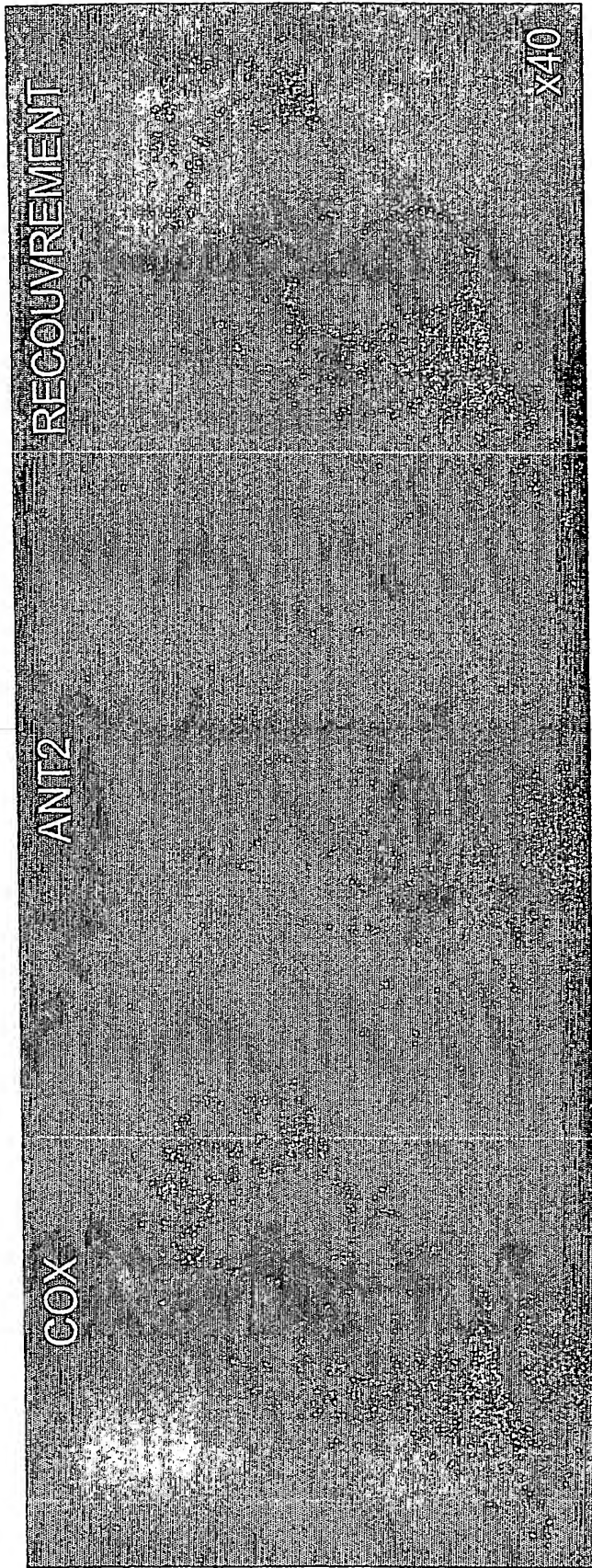


Figure 5B

RNA interference on transfected hAnt1 and hAnt2

anti-V5 Western blot

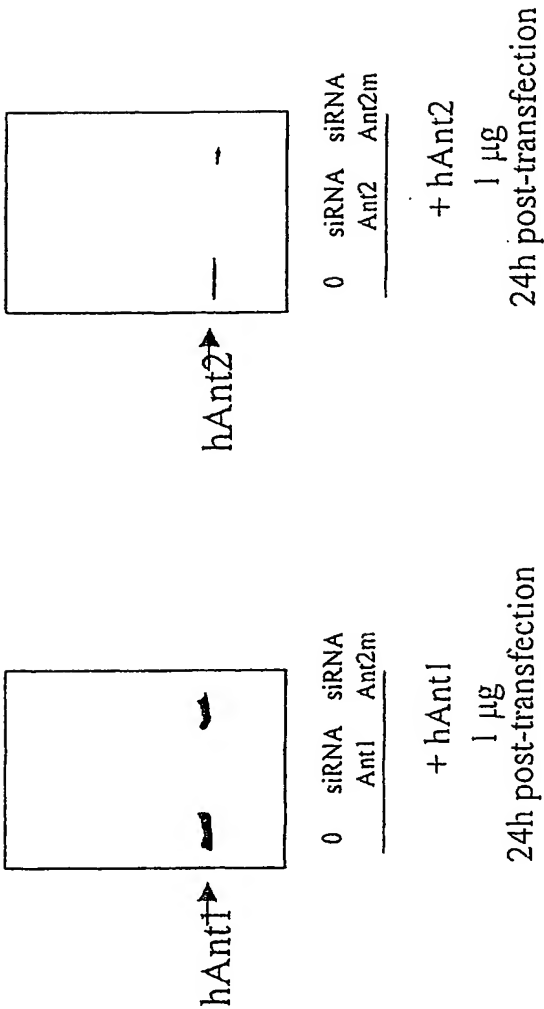


Figure 6

Interférence à ARN sur des cellules transfectées par hANT1 et 2

Immuno transfert anti-V5

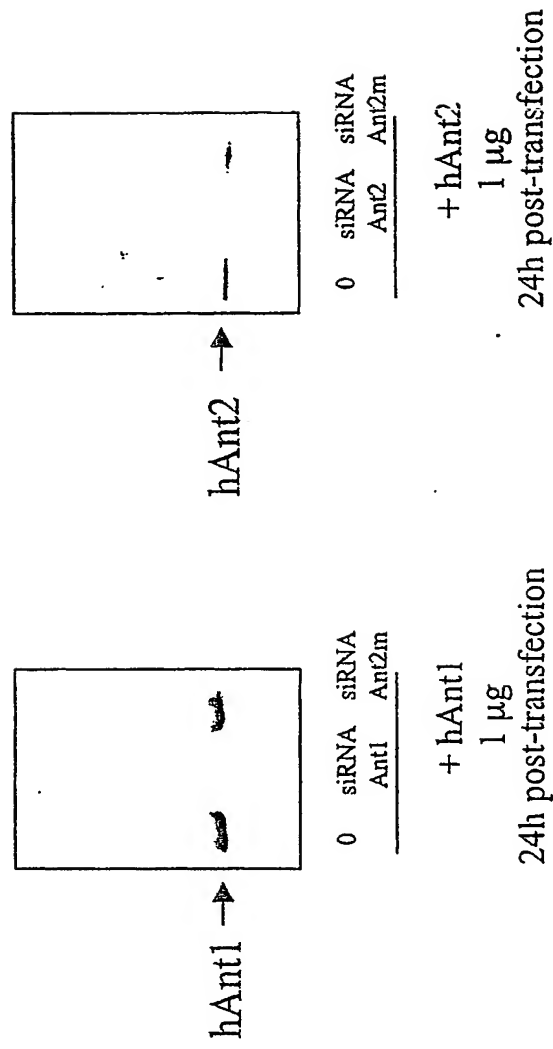


Figure 6

60889.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> THERAPTOSIS

<120> MOYENS POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES HUMAINES DE L'ANT

<130> 60889

<140> FR 03 00622

<141> 2003-01-21

<160> 21

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> desoxythymidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> desoxythymidine

<400> 1

acagaucagu gcugagaagn n

21

<210> 2

<211> 21

60889.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> THERAPTOSIS

<120> MOYENS POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES HUMAINES DE L'ANT

<130> 60889

<140> FR 03 00622

<141> 2003-01-21

<160> 33

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> desoxythymidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> desoxythymidine

<400> 1
acagaucagu gcugagaagn n

21

<210> 2

<211> 21

60889.ST25

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 2

cuucucagca cugaucugun n

21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 3

gcagaucacu gcagauaagn n

21

<210> 4

<211> 21

60889.ST25

<212> RNA
<213> Human

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Deoxythimidine

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Deoxythimidine

<400> 2
cuucucagca cugaucugun n

21

<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> Human

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> Deoxythimidine

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> Deoxythimidine

<400> 3
gcagaucacu gcagauaagn n

21

<210> 4
<211> 21

60889.ST25

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<400> 4

cuuauugca gugaucugcn n

21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 5

gggcaucgug gacugcauun n

21

<210> 6

<211> 21

<212> RNA
 <213> Human

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> deoxythimidine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> deoxythimidine

<400> 4
 cuuauugca gugaucugcn n

21

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Human

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (20)..(20)
 <223> deoxythimidine

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> deoxythimidine

<400> 5
 gggcaucgug gacugcauun n

21

<210> 6
 <211> 21

60889.ST25

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 6

aaugcagucc acgaugcccn n

21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 7

aaacagatca gtgctgagaa g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

aagcagatca ctgcagataa g

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

60889.ST25

<212> RNA
<213> Human

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)..(20)
<223> deoxythimidine

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)..(21)
<223> deoxythimidine

<400> 6
aaugcagucc acgaugcccn n

21

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Human

<400> 7
aaacagatca gtgctgagaa g

21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Human

<400> 8
aagcagatca ctgcagataa g

21

<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Human

60889.ST25

<400> 9
aagcggatcg ctacaaataa g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 10
aagggcatcg tggactgcat t

21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 11
acagaucagu gcugagaagn n

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<400> 9
aagcggatcg ctacaaataa g

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Human

<400> 10
aagggcatcg tggactgcat t

21

<210> 11

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 11
acagaucagu gcugagaagn n

21

<210> 12

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

60889.ST25

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 12
cuucucagca cugaucugun n

21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 13
gcagaucacu gcagauaagn n

21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 12
cuucucagca cugaucugun n

21

<210> 13

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> deoxythimidine

<400> 13
gcagaucacu gcagauaagn n

21

<210> 14

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

60889.ST25

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 14
cuuauugca gugaucugcn n

21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 15
gcggauugcu acaaauaagn n

21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 14
cuuauugca gugaucugcn n

21

<210> 15

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 15
gcggaucgcu acaaauaagn n

21

<210> 16

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

60889.ST25

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 16
cuuauuugua gcgauccgcn n

21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 17
gggcaucgug gacugcauun n

21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 16
cuuauuugua gcgauccgcn n

21

<210> 17

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 17
gggcaucgug gacugcauun n

21

<210> 18

<211> 21

<212> RNA

<213> Human

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

60889.ST25

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 18

aaugcagucc acgaugcccn n

21

<210> 19

<211> 894

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

atgggtgatc acgcttggag cttcctaaag gacttcctgg ccggggcggt cgccgctgcc	60
gtctccaaga ccgcggtcgc ccccatcgag aggggtcaaac tgctgctgca ggtccagcat	120
gccagcaaac agatcagtg c tgagaagcag tacaaaggga tcattgattg tgtggtgaga	180
atccctaagg agcagggctt cctctccttc tggaggggta acctggccaa cgtgatccgt	240
tacttcccca cccaagctct caacttcgcc ttcaaggaca agtacaagca gctcttctta	300
gggggtgtgg atcggcataa gcagttctgg cgctactttg ctggtaacct ggcgtccggt	360
ggggccgctg gggccacctc ctttgcttt gtctaccgcg tggactttgc taggaccagg	420
ttggctgctg atgtgggcag gcgcgcccag cgtgagttcc atggtctggg cgactgtatc	480
atcaagatct tcaagtctga tggcctgagg gggctctacc agggtttcaa cgtctctgtc	540
caaggcatca ttatctatag agctgcctac ttcggagtct atgatactgc caaggggatg	600
ctgcctgacc ccaagaacgt gcacatTTTT gtgagctgga tgattgcccc gagtgtgacg	660
gcagtcgcag ggctgctgtc ctaccctttt gacactgttc gtcgtagaat gatgatgcag	720
tccggccgga aaggggcccga tattatgtac acggggacag ttgactgctg gaggaagatt	780
gcaaaagacg aaggagccaa ggccttcttc aaaggtgcct ggtccaatgt gctgagaggc	840
atgggcggtg cttttgtatt ggtgttgtat gatgagatca aaaaatatgt ctaa	894

<210> 20

<211> 897

<212> DNA

<213> Human

<223> Deoxythimidine

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Deoxythimidine

<400> 18

aaugcagucc acgaugcccn n

21

<210> 19

<211> 894

<212> DNA

<213> Human

<400> 19

atgggtgatac acgcttggag cttcctaaag gacttcctgg ccggggcggt cgccgctgcc	60
gtctccaaga ccgcggtcgc ccccatcgag aggggtcaaac tgctgctgca ggtccagcat	120
gccagcaaac agatcagtgc tgagaagcag taaaaaggga tcattgattg tgtggtgaga	180
atccctaagg agcagggcctt cctctccttc tggaggggta acctggccaa cgtgatccgt	240
tacttcccca cccaagctct caacttcgcc ttcaaggaca agtacaagca gctcttctta	300
gggggtgtgg atcggcataa gcagttctgg cgctactttg ctggtaacct ggcggtccggt	360
ggggccgctg gggccacctc cctttgcttt gtctaccgcg tggactttgc taggaccagg	420
ttggctgctg atgtgggcag gcgcgcccag cgtgagttcc atgggtctggg cgactgtatc	480
atcaagatct tcaagtctga tggcctgagg gggctctacc agggtttcaa cgtctctgtc	540
caaggcatca ttatctatag agctgcctac ttcggagtct atgatactgc caaggggatg	600
ctgcctgacc ccaagaacgt gcacattttt gtgagctgga tgattgcca gagtgtgacg	660
gcagtcgcag ggctgctgtc ctaccctttt gacactgttc gtcgtagaat gatgatgcag	720
tccggccgga aaggggcca tattatgtac acggggacag ttgactgctg gaggaagatt	780
gcaaaagacg aaggagccaa ggccttcttc aaagggtgcct ggtccaatgt gctgagaggc	840
atgggcggtg cttttgtatt ggtgttgtat gatgagatca aaaaatatgt ctaa	894

<210> 20

<211> 897

<212> DNA

<213> Human

<400> 20
 atgacagatg ccgctgtgtc ctctcgccaag gacttccttg caggtggagt ggccgcagcc 60
 atctccaaga cggcggtagc gcccatcgag cgggtcaagc tgctgctgca ggtgcagcat 120
 gccagcaagc agatcactgc agataagcaa tacaaaggca ttatagactg cgtgggtccgt 180
 attcccaagg agcagggagt tctgtccttc tggcgcggta acctggccaa tgtcatcaga 240
 tacttcccca cccaggctct taacttcgcc ttcaaagata aatacaagca gatcttcctg 300
 ggtggtgtgg acaagagaac ccagtttttg cgctactttg cagggaatct ggcatcgggt 360
 ggtgccgcag gggccacatc cctgtgtttt gtgtaccctc ttgattttgc ccgtaccctg 420
 ctagcagctg atgtgggtaa agctggagct gaaagggaaat tccgaggcct cggtgactgc 480
 ctggttaaga tctacaaatc tgatgggatt aagggcctgt accaaggctt taacgtgtct 540
 gtgcagggta ttatcatcta ccgagccgcc tacttcggta tctatgacac tgcaaaggga 600
 atgcttcagg atcccaagaa cactcacatc gtcacagct ggatgatcgc acagactgtc 660
 actgctgttg ccgggttgac ttcctatcca ttgacaccg ttcgccgccg catgatgatg 720
 cagtcaaggc gcaaaggaac tgacatcatg tacacaggca cgcttgactg ctggcggaag 780
 attgctcgtg atgaaggagg caaagctttt ttcaagggtg catgggtcaa tgttctcaga 840
 ggcatgggtg gtgcttttgt gcttgtcttg tatgatgaaa tcaagaagta cacataa 897

<210> 21

<211> 897

<212> DNA

<213> Human

<400> 21
 atgacggaac aggccatctc ctctcgccaaa gacttccttg ccggaggcat cgccgccgcc 60
 atctccaaga cggccgtggc tccgatcgag cgggtcaagc tgctgctgca ggtccagcac 120
 gccagcaagc agatcgccgc cgacaagcag tacaaggga tcgtggactg cattgtccgc 180
 atccccaagg agcagggcgt gctgtccttc tggaggggca accttgccaa cgtcattcgc 240
 tacttcccca ctcaagcct caacttcgcc ttcaaggata agtacaagca gatcttcctg 300
 gggggcgtgg acaagcacac gcagttcttg aggtactttg cgggcaacct ggcctccggc 360
 ggtgcggccg gcgcgacctc cctctgcttc gtgtaccgc tggatttcgc cagaaccgc 420
 ctggcagcgg acgtgggaaa gtcaggcaca gagcgcgagt tccgaggcct gggagactgc 480
 ctggtgaaga tcaccaagtc cgacggcatc cggggcctgt accagggtt cagtgtctcc 540
 gtgcagggca tcatcatcta ccgggcggcc tacttcggcg tgtacgatac ggccaagggc 600
 atgctccccg accccaagaa cacgcacatc gtggtgagct ggatgatcgc gcagaccgtg 660

60889.ST25

<400> 20

atgacagatg ccgctgtgtc cttcgccaag gacttcctgg caggtggagt ggccgcagcc	60
atctccaaga cggcggtagc gcccacgag cgggtcaagc tgctgctgca ggtgcagcat	120
gccagcaagc agatcactgc agataagcaa tacaaaggca ttatagactg cgtgggtccgt	180
attcccaagg agcagggagt tctgtccttc tggcgcggtg acctggccaa tgtcatcaga	240
tacttcccca cccaggctct taacttcgcc ttcaaagata aatacaagca gatcttcctg	300
ggtggtgtgg acaagagaac ccagttttgg cgctactttg cagggaatct ggcacggtg	360
ggtgccgcag gggccacatc cctgtgtttt gtgtaccctc ttgattttgc ccgtaccctg	420
ctagcagctg atgtgggtaa agctggagct gaaagggaaat tccgaggcct cggtgactgc	480
ctggttaaga tctacaaatc tgatgggatt aagggcctgt accaaggctt taacgtgtct	540
gtgcagggta ttatcatcta ccgagccgcc tacttcggta tctatgacac tgcaaaggga	600
atgcttccgg atcccaagaa cactcacatc gtcacagct ggatgatcgc acagactgtc	660
actgctgttg ccgggttgac ttcctatcca ttgacaccg ttcgccgccg catgatgatg	720
cagtcagggc gcaaaggaac tgacatcatg tacacaggca cgcttgactg ctggcggaag	780
attgctcgtg atgaaggagg caaagctttt ttcaagggtg catggtccaa tgttctcaga	840
ggcatgggtg gtgcttttgt gcttgtcttg tatgatgaaa tcaagaagta cacataa	897

<210> 21

<211> 897

<212> DNA

<213> Human

<400> 21

atgacggaac aggccatctc cttcgccaaa gacttcttgg ccggaggcat cgccgccgcc	60
atctccaaga cggccgtggc tccgatcgag cgggtcaagc tgctgctgca ggtccagcac	120
gccagcaagc agatcgccgc cgacaagcag tacaaggga tcgtggactg cattgtccgc	180
atccccaagg agcagggcgt gctgtccttc tggaggggca accttgccaa cgtcattcgc	240
tacttcccca ctcaagccct caacttcgcc ttcaaggata agtacaagca gatcttcctg	300
gggggcgtgg acaagcacac gcagttctgg aggtactttg cgggcaacct ggcctccggc	360
ggtgcggccg gcgcgacctc cctctgcttc gtgtaccgc tggatttcgc cagaaccgc	420
ctggcagcgg acgtgggaaa gtcaggcaca gagcgcgagt tccgaggcct gggagactgc	480
ctggtgaaga tcaccaagtc cgacggcatc cggggcctgt accagggctt cagtgtctcc	540
gtgcagggca tcatcatcta ccgggcggcc tacttcggcg tgtacgatac ggccaagggc	600
atgctccccg accccaagaa cacgcacatc gtggtgagct ggatgatcgc gcagaccgtg	660

60889.ST25

acggccgtgg ccggcgtggt gtcctacccc ttcgacacgg tgcggcggcg catgatgatg	720
cagtccgggc gcaaaggagc tgacatcatg tacacgggca ccgtcgactg ttggaggaag	780
atcttcagag atgagggggg caaggccttc ttcaagggtg cgtggtccaa cgtcctgcgg	840
ggcatggggg gcgccttcgt gctggtcctg tacgacgagc tcaagaaggt gatctaa	897



60889.ST25
acggccgtgg cggcggtggt gtcctacccc ttcgacacgg tgcggcggcg catgatgatg 720
cagtccgggc gcaaaggagc tgacatcatg tacacgggca ccgtcgactg ttggaggaag 780
atcttcagag atgagggggg caaggccttc ttcaagggtg cgtggtccaa cgtcctgcgg 840
ggcatggggg ggcgccttcgt gctggtcctg tacgacgagc tcaagaaggt gatctaa 897

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 22
atgggtgatc acgcttggag cttcctaaag 30

<210> 23

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 23
ttagacatat tttttgatct catcatacaa 30

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 24
atgacagatg ccgctgtgtc cttcgccaag 30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 25
ttatgtgtac ttcttgattt catcatacaa 30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 26
atgacggaac aggccatctc cttcgccaaa

30

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Human

<400> 27
ttagatcacc ttcttgagct cgtcgtacag

30

<210> 28

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 28
taaggtagca tgggtgatca cgcttgga

28

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Human

<400> 29
atctcgagga catatctttt gatctc

26

<210> 30

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 30
taaggtagca tgacagatgc cgctgtgt

28

<210> 31

60889.ST25

<211> 26

<212> DNA

<213> Human

<400> 31

atctcgagtg tgtacttctt gatcttc

26

<210> 32

<211> 28

<212> DNA

<213> Human

<400> 32

taagggtacca tgacggaaca ggccatct

28

<210> 33

<211> 26

<212> DNA

<213> Human

<400> 33

atctcgtgga tcaccttctt gagctc

26

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif) CP 60889

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 03 00 622

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

MOYENS POUR LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES ISOFORMES HUMAINES DE L'ANT

LE(S) DEMANDEUR(S) :

THERAPTOSIS

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

1 Nom BORGNE
Prénoms Annie
Adresse Rue 10, Rue de Budapest
Code postal et ville 75009 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)

2 Nom REBOUILLAT
Prénoms Dominique
Adresse Rue 36, Rue du Hameau
Code postal et ville 75015 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)

3 Nom JACOTOT
Prénoms Etienne
Adresse Rue 171, Rue Lecourbe
Code postal et ville 75015 PARIS
Société d'appartenance (facultatif)

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Mandataire : Chantal PEAUCELLE

92-1189

Le 12 mai 2003

Chantal Peaucelle

PCT/FR2004/000127

